

Untersuchungen zur Funktion der Peroxisomen verschiedener Xanthophyceen

Vom Fachbereich Biologie
der Universität Oldenburg
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
angenommene Dissertation

Wolfgang Groß
geb. am 17. April 1958
in Westerstederfeld (Ammerland)

1987

Untersuchungen zur Funktion der Peroxisomen
verschiedener Xanthophyceen.

Vom Fachbereich Biologie
der Universität Oldenburg
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
angenommene Dissertation

Wolfgang Groß

geb. am 17. April 1958

in Westerstederfeld (Ammerland)

Erstreferent: Prof. Dr. H. Stabenau

Korreferent: Prof. Dr. A. Willig

Tag der Disputation: 18. Februar 1987

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. EINLEITUNG

1

II. MATERIAL und METHODEN

7

1. Anzucht der Algen

7

2. Analytische Untersuchungsmethoden

9

a) Colorimetrische Bestimmungsmethoden

9

b) Lipid-Extraktion und Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung

9

c) Auftrennung organischer Säuren aus einem Reaktionsansatz

11

d) Nachweis von Glykolat und Glyoxylat aus dem Nährmedium mit Hilfe der HPLC

12

3. Durchführung der Markierungsversuche

13

4. Herstellung des Zellextraktes

14

5. Enzymanreicherung und Reinigung

14

6. Isolierung von Zellorganellen mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation

15

a) Aufschlußmethode für Bumilleriopsis, Heterococcus, Tribonema und Botrydium

15

b) Aufschlußmethode für Vaucheria

16

c) Herstellung des Saccharose-Dichtegradienten

17

d) Herstellung des PERCOLL-Gradienten

17

7. Bestimmung der Photosyntheseleistung

18

8. Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie

18

III. E R G E B N I S S E	20
1. Kultur der Algen	20
2. Ultrastrukturelle Untersuchung der Algen	23
3. Stoffwechselphysiologische Untersuchungen an <i>Bumilleriopsis filiformis</i>	35
a) Nachweis und Charakterisierung von Enzymen des Glykolatstoffwechsels	35
b) Intrazelluläre Lokalisation verschiedener Enzyme	37
c) Mögliche Wege eines Umsatzes von Glyoxylat und deren Überprüfung	40
d) Carnitin-Acetyltransferasen als Transportsystem für Acetyl-CoA	48
e) Verknüpfung von Glyoxylat-Produktion und Malat-Synthese	53
f) Untersuchungen zum Fettsäuretransport durch die Mitochondrienmembran	62
4. Die peroxisomale und mitochondriale Enzymausstattung von <i>Vaucheria</i>	65
5. Versuche zur Zellorganelltrennung an <i>Heterococcus</i> , <i>Tribonema</i> und <i>Botrydium</i>	67
6. Vergleichende enzymatische Untersuchungen an verschiedenen Xanthophyceen	70
IV. D I S K U S S I O N	75
V. Z U S A M M E N F A S S U N G	83
VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	85
VII. A N H A N G	103

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

ADP	=	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	=	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	=	Adenosin-5'-triphosphat
Bicin	=	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycin
BSA	=	Rinderserumalbumin
DCPIP	=	Dichlorphenolindophenol
Deamino-NAD	=	3-Acetylpyridin-hypoxanthin-dinucleotid
DMAB	=	3-(Dimethylamino)benzoesäure
dpm	=	Zerfallsrate (Zerfall pro Minute)
DTNB	=	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	=	Dithiothreitol
EDTA	=	Äthylendiamintetraessigsäure
FAD	=	Flavin-adenin-dinucleotid
HEPES	=	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
INT	=	p-Iodonitrotetrazolium violett
MBTH	=	3-Methyl-2-benzothiazolinon Hydrazon
MSTFA	=	N-Trimethylsilyl-N-methyltrifluoracetamid
NAD	=	ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADP	=	ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
PMS	=	Phenazinmethosulfat
THF	=	Tetrahydrofolat
Tricin	=	N-Tris(hydroxymethyl)methylglycin
Tris	=	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

U = Substratumsatz von 1 µmol pro min

Chemikalien:

Amersham Buchler GmbH, Braunschweig: (1-¹⁴C)-Glykolat.
Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim: Glutamat-Dehydrogenase,
Citrat-Synthetase, Malat-Dehydrogenase.
Serva, Heidelberg: Chemikalien für die Einbettung nach SPURR,
Na-Cacodylat, Tris.
Beckman Inst., München: Scintillatorflüssigkeit-Readysolv MP.
Sigma-Chemie GmbH, München: Alle weiteren Biochemica.
E. Merk KG, Darmstadt: Alle weiteren Chemikalien.

Geräte:

Flüssigkeitsscintillationszähler (Model Tricarb 460):
Packard Inst. GmbH, Frankfurt
Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Anlage bestehend aus,
zwei HPLC-Pumpen 2150, Durchflußmonitor 2151, Controller 2152
und Fraktionssammler (Superrac) 2211:
LKB Inst. GmbH, Gräfelfing
Ion exclusion-Säule (Aminex HPX 87H): Bio-Rad Lab. GmbH, München
Gas-Chromatograph (Model 8320): Perkin-Elmer GmbH, Überlingen
Photometer (Model Uvikon 810 und 860): Kontron Inst., München
Zentrifugen
(Minifuge GL mit Rotor 2150): Heraeus Christ GmbH, Osterode/Harz
(Model J 2-21 Centrifuge mit Rotor JS-13,
Model L 8-70 Ultrazentrifuge mit Rotor SW 28 und SW 60 Ti):
Beckman Inst. GmbH, München
Dichtegradientenfraktionierer (Model 640): ISCO, Lincoln (USA)
Mikroskope (EM 109): C. Zeiss, Oberkochen
(Dialux 22/22 EB): E. Leitz GmbH, Wetzlar
Zellaufschlußgeräte
(Homogenizer "Virtis-45"): Cenco Inst., Breda (Holland)
(Potter-Elvehjem-Homogenisator): B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Licht-Thermostat: Kniese, Göttingen
Rank-Elektrode : Bachhofer, Reutlingen
Filter: Satorius GmbH, Göttingen
Nylon-Siebe: ZBK, Rüschnikon
Glasperlen (0.45 - 0.50 mm): B. Braun Melsungen AG, Melsungen

I. EINLEITUNG

Die Bezeichnung "Microbody" wurde erstmals 1954 von RHODIN für Strukturen in tierischen Zellen verwendet, deren Kennzeichen eine einfache umgrenzende Membran und eine im elektronenmikroskopischen Bild homogene feingranuläre Matrix ist. In den darauffolgenden Jahren wurden ähnliche Organellen auch in pflanzlichen Zellen beobachtet, jedoch mit unterschiedlichen Bezeichnungen belegt, da die ultrastrukturelle Übereinstimmung mit den Microbodies tierischer Zellen noch nicht erkannt wurde (MANTON 1961, THORNTON & THIMANN 1964, SEMADENI 1967, FALK & KLEINIG 1968). Erst vor etwa zwanzig Jahren fand die Bezeichnung "Microbody" Eingang auch in die Terminologie der Pflanzencytologie (MOLLENHAUER et al. 1966).

Microbodies werden heute allgemein als Bestandteil aller eukaryotischen Zellen angesehen (GERHARDT 1978). Die etwa 0.5 - 1.5 μm großen Microbodies der höheren Pflanzen lassen auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen häufig eine enge räumliche Beziehung zu anderen Zellorganellen oder zu Vesikeln erkennen. Es ist jedoch weitgehend von dem Gewebetyp abhängig, welche Zellbestandteile an dieser Assoziation beteiligt sind (FREDERICK et al. 1975). In jungen, undifferenzierten Zellen stehen die Microbodies vielfach in engem Kontakt mit ER-Segmenten und Dictyosomen (FREDERICK et al. 1968 und 1975). Charakteristisch für die Microbodies in Laubblättern und fettreichen Geweben keimender Samen ist die Assoziation mit Mitochondrien und Chloroplasten (FREDERICK & NEWCOMB 1969, GRUBER et al. 1973) bzw. mit Lipidkörpern (VIGIL 1970, TRELEASE et al. 1971).

Die in den morphologischen Merkmalen relativ einheitlichen Microbodies weisen im Hinblick auf ihre enzymatische Ausstattung eine große Variabilität auf. Als allgemeines biochemisches Merkmal aller Microbodies wird der Besitz von Katalase und einer H_2O_2 -bildenden Oxidase angesehen. In diesem Zusammenhang wurde von DE DUVE & BAUDHUIN 1966 die Bezeichnung Peroxisom eingeführt. Die Begriffe Microbody und Peroxisom werden oftmals synonym verwendet, bezeichnen jedoch, wie auch in der vorliegenden Arbeit, den morphologischen bzw. biochemisch-funktionellen Aspekt dieser Organellen (GERHARDT 1978).

Die stoffwechselphysiologische Funktion der Peroxisomen konnte bisher nur in zwei pflanzlichen Gewebetypen eindeutig definiert werden.

Peroxisomen als spezialisierter Funktionstyp Glyoxysom sind ausschließlich in photosynthetisch inaktiven fettreichen Geweben festgestellt worden. Eine Ausnahme stellen die Befunde von KINDL & MAJUNKE (1973a) dar, die das Vorkommen von Glyoxysomen in den Laubblättern von *Lens culinaris* belegen. Wie im Namen bereits angedeutet, ist der Glyoxylat-Zyklus Bestandteil der Glyoxysomen (BREIDENBACH & BEEVERS 1967). Das Substrat für den Glyoxylat-Zyklus, das Acetyl-CoA, wird durch die ebenfalls in den Glyoxysomen lokalisierte β -Oxidation bereitgestellt (HUTTON & STUMPF 1969, COOPER & BEEVERS 1969). Insgesamt kommt diesen Organellen eine entscheidende Funktion bei der Umwandlung von Speicherfett in Kohlenhydrat zu.

Den zweiten spezialisierten Funktionstyp der pflanzlichen Microbodies bilden die sogenannten Blatt-Peroxisomen, die aus dem Mesophyll von Laubblättern isoliert werden konnten (TOLBERT et al. 1968). In diesen Organellen sind die Teilreaktionen des photosyntheseabhängigen Glykolatstoffwechsels lokalisiert, die den Umsatz von Glykolat zu Glycin und von Serin zu Glycerat katalysieren. Als Leitenzyme der Blatt-Peroxisomen werden insbesondere die Hydroxypyruvat-Reduktase

und die Glykolat-Oxidase angesehen. Diese Enzyme sind in anderen Peroxisomen bisher nicht bzw. nur mit sehr geringer Aktivität festgestellt worden. Bei einigen Pflanzen konnten darüber hinaus Enzyme der β -Oxidation in den Blatt-Peroxisomen nachgewiesen werden; es ist jedoch Gegenstand eingehender Diskussion, ob dies ein generelles Merkmal der (Blatt-) Peroxisomen ist (GERHARDT 1983, WOOD et al. 1986).

Unter dem Sammelbegriff "Microbodies unspezialisierter Funktion" werden die in einer Vielzahl verschiedener Gewebe nachgewiesenen Peroxisomen zusammengefaßt, denen gegenwärtig keine eindeutige Stoffwechselfunktion zugeordnet werden kann (HUANG & BEEVERS 1971). Als H_2O_2 -bildende Oxidase kommt bei den meisten Organellen dieser Gruppe Uricase, ein Enzym des Urat-Stoffwechsels, vor. Außerdem ließen sich in "unspezialisierten" Peroxisomen Enzyme der β -Oxidation nachweisen (GERHARDT 1983).

Bei Algen konnte das Vorkommen von Microbodies durch Befunde zahlreicher ultrastruktureller Untersuchungen belegt werden (BOUCK 1965, BIBBY & DODGE 1973, OAKLEY & DODGE 1974, SILVERBERG 1975). Lediglich bei den Bacillariophyceen bestehen Zweifel über das Vorkommen dieser Organellen (PAUL et al. 1975). Ähnlich wie bei höheren Pflanzen können auch die Microbodies der Algen mit anderen Zellstrukturen assoziiert sein. Die Art der hierbei beteiligten Zellbestandteile unterscheidet sich jedoch vielfach von denen der höheren Pflanzen. In einigen Algen ließen sich enge räumliche Beziehungen der Microbodies z.B. zu Zellkernen (STEWART et al. 1972, MOESTRUP 1974, GROSS 1984), Basalkörpern der Geißelbasis (NORRIS & PEARSON 1975), Pyrenoiden (NILSHAMMAR & WALLIS 1974 oder bisher nicht näher definierten Strukturen (BIBBY & DODGE 1973) beobachten. Die für bestimmte Gewebearten der höheren Pflanzen typische Beziehung der Microbodies zu Lipidkörpern

bzw. Mitochondrien und Chloroplasten ist dagegen bei Algen nur selten festzustellen.

Über die stoffwechselphysiologische Funktion der Peroxisomen in Algen liegen in der Literatur nur wenige Informationen vor. Ein wesentlicher Grund dafür ist die Tatsache, daß die Isolierung von Microbodies aus diesen Organismen in den meisten Fällen erhebliche methodische Schwierigkeiten bereitet. Außerdem ist die spezifische Aktivität peroxisomaler Enzyme in Algen wesentlich geringer als in höheren Pflanzen (FREDERICK et al. 1973).

Bisher sind aus acht Grünalgen-Arten und einem Vertreter der Chrysophyceen Microbodies zur biochemischen Charakterisierung isoliert worden (LUI et al. 1968, GERHARDT 1978, STABENAU 1984b).

Peroxisomen, die dem Funktionstyp Glyoxysom entsprechen, konnten bei Algen bisher nicht festgestellt werden, obwohl einige der untersuchten Arten glyoxysomale Enzyme aufweisen (GERHARDT 1971, COOPER & LLOYD 1972, STABENAU & BEEVERS 1974). In Partikeln von heterotroph angezogenen *Euglena*, die im Saccharose-Gradienten bei einer Dichte von $1,20 \text{ g/cm}^3$ angereichert werden konnten, wurden zwar Enzyme des Glyoxylat-Zyklus nachgewiesen, diese Organellen besitzen jedoch keine Katalase. Befunde von BRODY & WHITE (1972), die auf das Vorkommen von Katalase in *Euglena* hindeuten, ließen sich von anderen Autoren nicht bestätigen (LORD & MERRETT 1971, GRAVES & BECKER 1974, BRUNOLD & SCHIFF 1976), so daß definitionsgemäß die aus *Euglena* isolierten Organellen nicht als Glyoxysomen bzw. Peroxisomen bezeichnet werden können.

In autotroph angezogenen Zellen der Charophyceen *Spirogyra* und *Mougeotia* wurden Microbodies nachgewiesen, die dem blattperoxisomalen Funktionstyp entsprechen (STABENAU 1976, STABENAU & SÄFTEL 1981). Wie Untersuchungen an *Mougeotia* ergeben haben, besitzen auch diese Organellen Enzyme der β -Oxidation und sind auch darin den Blatt-Peroxisomen höherer Pflanzen ähnlich (STABENAU et al. 1984a).

Die meisten der bisher untersuchten Algen weisen Peroxisomen auf, denen gegenwärtig keine eindeutige Funktion im Stoffwechselablauf zugeordnet werden kann (LUI et al. 1968, GERHARDT 1971, CODD et al. 1972, STABENAU 1974b, STABENAU & BEEVERS 1974, COLLINS & MERRETT 1975, STABENAU et al. 1984b). In den sogenannten "unspezialisierten" Peroxisomen der Chlorophyceae Eremosphaera konnten neben Katalase und Uricase auch Enzyme der β -Oxidation nachgewiesen werden (STABENAU et al. 1984a).

Die β -Oxidation sollte hauptsächlich in solchen Algen von dominierender Bedeutung sein, in denen Fette gespeichert werden. Obwohl fast alle Algen unter bestimmten Umweltbedingungen in der Lage sind Lipide zu akkumulieren, stellen Neutralfette jedoch nur in Vertretern der Gruppe der Heterokontophyta eine typische Reservesubstanz dar (TRAINOR 1978). Die Heterokontophyta, zu denen die Bacillario-, Chloromonado-, Chryso-, Phaeo- und die Xanthophyceen gezählt werden, besitzen somit fettspeichernde und zugleich photosynthetisch aktive Zellen. Organismen der oben genannten Gruppen lassen sich in dieser Hinsicht mit den Zellen fettreicher ergrünender Kotyledonen der höheren Pflanzen vergleichen, in denen sowohl blatt-peroxisomale als auch glyoxysomale Enzyme nachgewiesen wurden (SCHNARRENBARGER et al. 1971, GERHARDT 1973).

Unter diesem Gesichtspunkt ergab sich die Frage, welche Funktion den Peroxisomen der genannten Algengruppen zukommt. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob es Hinweise gibt, die auf eine Beziehung zwischen der Funktion der Microbodies und der Organisationsstufe sowie des Lebensraumes der zu untersuchenden Algen hindeuten.

Als Versuchsobjekte wurden Arten aus der Gruppe der Xanthophyceen gewählt, da sie eine Auswahl verschiedener Organisationsstufen bieten, die wiederum unterschiedliche Lebensräume besiedeln. Ein weiterer Grund für diese Auswahl waren auch die aus Vorversuchen gewonnenen Ergebnisse an *Bumilleriopsis filiformis*, die auf eine Besonderheit im Glykolatstoffwechsel hindeuten (GROSS 1984).

Weiterhin ergaben die Vorversuche, daß die Isolierung von Zellorganellen aus *Bumilleriopsis filiformis* ohne größere Schwierigkeiten möglich ist - eine unabdingbare Voraussetzung für die geplanten Untersuchungen. Die weiteren in die Untersuchung einbezogenen Organismen wurden nach den Gesichtspunkten Organisationsstufe, Lebensraum und Wachstum ausgewählt.

Bumilleriopsis filiformis

coccal; bodenbewohnend; limnisch; hohe Wachstumsrate.

Heterococcus crassulus

trichal; bodenbewohnend; limnisch; hohe Wachstumsrate.

Tribonema aequale

trichal; Teiche, Seen; limnisch; hohe Wachstumsrate.

Botrydium granulatum

siphonal; Teichufer, Seen; limnisch; mittlere Wachstumsrate.

Vaucheria spec.

siphonal; Wattsediment; marin; mittlere Wachstumsrate.

II. MATERIAL und METHODEN

1. Anzucht der Algen

Bumilleriopsis filiformis Vischer (809-2), *Heterococcus crassulus* Vischer (835-4), *Tribonema aequale* Pascher (880-1) und *Botrydium granulatum* (Greville) var. *kolkwitzianum* Vischer (805-2) wurden von der Sammlung von Algenkulturen des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen bezogen.

Als Nährlösung für diese Arten diente das von HESSE (1974) entwickelte vollsynthetische Medium XN-4:

KNO_3	8.00×10^{-3}
NaNO_3	8.00×10^{-3}
NaH_2PO_4	3.40×10^{-3}
Na_2HPO_4	1.00×10^{-3}
MgSO_4	1.00×10^{-3}
CaCl_2	2.30×10^{-4}
H_3BO_3	4.30×10^{-5}
FeSO_4 als EDTA-Komplex	4.00×10^{-5}
MnCl_2	1.55×10^{-5}
ZnSO_4	3.89×10^{-6}
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2$	1.35×10^{-6}
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	4.70×10^{-7}
CuSO_4	2.80×10^{-7}
Na_3VO_4	6.00×10^{-8}

Nährlösung und Kulturgefäße wurden vor Gebrauch im Autoklaven 30 Minuten bei 1.5 atm. sterilisiert.

Die Phosphat-Lösung dieses Nährmediums wurde separat autoklaviert und nach Erkalten der Lösung unter sterilen Bedingungen hinzugefügt.

Vaucheria spec. wurde im September 1985 im oberen Eulitoral der Rückseitenwatten der Insel Spiekeroog gesammelt und nach der Methode von ÅBERG & FRIES (1976) von Begleitorganismen gereinigt.

Das Kulturmedium (V_E) für die Anzucht von *Vaucheria spec.* setzt sich wie folgt zusammen:

899 ml halbkonzentriertes Seewasser

100 ml Nährlösung XN-4

66 mg $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

1 ml Spuren ASP (nach McLACHLAN 1964)

1 μg Vitamin B_{12}

Die Entkeimung erfolgte durch Sterilfiltration.

Als Kulturgefäße dienten Glasröhren (4 cm Durchmesser, 350 ml Volumen, mit bodenseitigem Belüftungsrohr), die jeweils mit Silikonschaumkappen verschlossen waren.

Um bei der Anzucht von *Vaucheria* eine gleichmäßige Verteilung der Zellfäden im Nährmedium zu erreichen, wurde ein Nylonnetz (Maschenweite 2 mm) in die Kulturröhre gestellt.

Die Belüftung der Kulturen erfolgte mit keimfreier Luft, angereichert mit 2 Vol.-% CO_2 , durch das bodenseitige Glasrohr.

Zur konstanten Temperierung (20°C) standen die Kulturröhren in einem thermostat-gesteuerten Wasserbad. Die Beleuchtungseinrichtung setzte sich aus Osram- L40W/30-1 warmton- und Osram-L40/25-1 weißuniversal-Leuchtstoffröhren (Verhältnis 1:1) zusammen. Die Lichtstärke betrug etwa 8000 Lux.

Vaucheria-Kulturen wurden im Licht-Dunkel-Wechsel (15:9 h) angezogen, die Anzucht der anderen Arten erfolgte im Dauerlicht.

2. Analytische Untersuchungsmethoden

a) Colorimetrische Bestimmungsmethoden

Der Gesamt-Chlorophyllgehalt wurde nach Angaben von PARSONS & STRICKLAND (1963) sowie in einigen Fällen nach der Methode von BÜGER (1964) ermittelt (s. Anhang).

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach der Methode von LOWRY et al. (1951) (s. Anhang).

Die Glykolat-Konzentration im Nährmedium wurde entweder colorimetrisch nach der Vorschrift von CALKINS (1943) oder mit Hilfe der HPLC (Kapitel 2d) ermittelt. Das für diese Versuche verwendete Nährmedium enthielt pro Liter folgende Mineralsalze:

1 g Ammoniumhydrogenphosphat, 50 mg Kaliumchlorid, 200 mg Magnesiumsulfat $\times 7 \text{ H}_2\text{O}$ und 67 mg Calciumchlorid; der pH-Wert wurde mit Phosphorsäure auf einen Wert von 7.0 eingestellt.

Alle Enzymtests wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt; die Zusammensetzung der verschiedenen Reaktionsansätze ist dem Anhang zu entnehmen.

Die Extraktion und Reinigung des löslichen intrazellulären Oxalates wurde in Anlehnung an BAKER (1952) (s. Anhang) durchgeführt, die Bestimmung der Oxalat-Konzentration erfolgte nach einer säulenchromatographischen Analyse mit Hilfe eines Eich-Standards. (Siehe Kapitel 2c).

b) Lipid-Extraktion und Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung

Für diese Untersuchungen wurden die Algen abzentrifugiert (10 min bei 3000 xg), der Überstand quantitativ abgegossen,

250 mg der gesammelten Zellen für die Trockengewichtsbestimmung abgewogen und weitere 250 mg Algenmaterial mit 100 ml 1N methanolischer KOH übergossen. Nach 30-minütigem Sieden am Rückflußkühler wurde die warme Lösung filtriert und der Rückstand mit 20 ml Methanol gewaschen. Anschließend wurde das Filtrat mit Hilfe eines Rotationsverdampfers auf ca. 10 ml eingeengt, mit 40 ml H₂O dest. versetzt und der pH-Wert mit konzentrierter HCl auf einen Wert von 2 eingestellt.

Die Extraktion der Fettsäuren erfolgte durch viermaliges Ausschütteln der wässrigen Phase mit je 20 ml Diethylether. Nach Eindampfen der vereinigten Etherphasen wurde der wasserfreie Rückstand in 3 ml Chloroform gelöst, filtriert (0.45 µm), nochmals zur Trockene eingedampft und anschließend in 2 ml Chloroform gelöst.

Nach der Syllisierung eines Aliquots dieser Lösung mit zwei Teilen MSTFA (15 min bei 100°C) wurde jeweils 1 µl zur Analyse in einen Gas-Chromatographen injiziert.

Als Interner Standard diente 100 µl Pentadecansäure (10 mM), die dem Algenmaterial vor der Verseifung zugesetzt wurde.

Die Trockengewichtsbestimmung erfolgte in kleinen Glaschalen, die bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurden.

Gas-Chromatographische Analyse der Fettsäuren

Trennprogramm: Temperatur von 40–290°C, 30°C pro min
Injektortemperatur: 290°C
Detektortemperatur: 290°C
Trärgas: N₂, Fluß: 30 ml/min
Säule: Silica-Kapillarsäule, 10 m Länge,
Innendurchmesser 0.23 mm
Füllmaterial: Permaphase DMS 0.3 µm
Detektor: FID

Berechnung des Fettsäure- und Gesamtfettgehaltes:

Zunächst wurden die Flächenintegrale der einzelnen Fettsäuren mit Hilfe eines Standard-Chromatogramms in Gewichtseinheiten umgerechnet. Mit Hilfe des Flächenintegrals des Internen Standards und den Ergebnissen der Trockengewichtsbestimmung konnte anschließend das tatsächliche Gewicht der verschiedenen Fettsäuren pro Gramm Trockengewicht ermittelt werden.

Zur Berechnung des Gesamtfettgehaltes wurde das Gewicht jeder nachgewiesenen Fettsäure durch das dazugehörige Molekulargewicht dividiert und die erhaltenen Werte addiert. Da der Hauptanteil der extrahierten Fette vermutlich in Form von Triglyceriden vorlag, wurde der errechnete Wert durch drei dividiert, um den molaren Anteil des Glycerins zu ermitteln. Dieser Wert wurde mit Hilfe des Molekulargewichtes in Gewichtseinheiten umgerechnet und zu dem Gesamtgewicht der Fettsäuren addiert. Um den Gesamtfettgehalt zu ermitteln wurde von dem erhaltenen Wert das Gewicht des bei der Bildung der Esterbindung abgespaltenen Wassers subtrahiert.

c) Auftrennung organischer Säuren aus einem Reaktionsansatz

Zur Entfernung der Proteine wurde die Probe in einem dünnwandigen Reagenzglas zwei Minuten auf 70°C erhitzt, eine Stunde ins Eisbad gestellt und anschließend hochtourig zentrifugiert.

Die Vorreinigung der proteinfreien Probe erfolgte durch Chromatographie an QAE-Sephadex (Q-25 120, vorbehandelt nach Angaben von REDGWELL (1980), Säulenvolumen: 2ml). Zur Elution dienten jeweils folgende drei Schritte:

- A) 1 ml proteinfreie Probe + 9 ml bidest. Wasser:
Eluat = Aminosäuren/Zucker
- B) + 10 ml Ameisensäure (4% v/v):
Eluat = Organische Säuren
- C) + 2 ml bidest. Wasser + 10 ml Salzsäure (1N):
Eluat = Phosphatester/Oxalat/(Oxalacetat)

Das in Schritt B erhaltene Eluat (organische Säuren) wurde anschließend bei 35°C im Rotationsverdampfer auf etwas weniger als einen Milliliter eingengt, mit bidest. Wasser auf einen Milliliter aufgefüllt, durch ein 0.2 µm-Filter filtriert und zur Analyse verwendet.

Die Trennung der organischen Säuren erfolgte mit Hilfe einer HPLC-Anlage, ausgestattet mit einer "Ion-exclusion"-Säule (Aminex HPX 87H), die je nach Zusammensetzung der organischen Säuren mit verschiedenen Schwefelsäurekonzentrationen isokratisch eluiert wurde.

Die Absorption des Eluats wurde mit Hilfe eines Durchflußmonitors bei einer Wellenlänge von 210 nm verfolgt.

- d) Nachweis von Glykolat und Glyoxylat aus dem Nährmedium mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie:

Für diese Untersuchungen wurden die Algen in nitratfreier Nährlösung (siehe Kapitel 2a) kultiviert. Nach bestimmten Zeitintervallen (1-3 Stunden) wurde ein Aliquot der Nährlösung zentrifugiert, der Überstand mit konzentrierter Schwefelsäure (Endkonzentration: 0.1 N) versetzt und eine Stunde ins Eisbad gestellt. Nach einer anschließenden Zentrifugation (15 min bei 3000 xg) und Filtration erfolgte die Analyse des Überstandes mit Hilfe der HPLC (s. Kapitel 2c).

3. Durchführung der Markierungsversuche

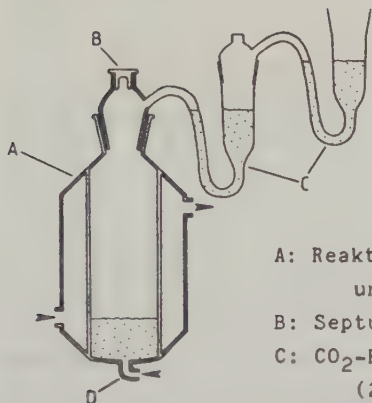


Abbildung 1:
Versuchsaufbau

A: Reaktionsgefäß mit Temperiermantel
und Schliffverbindung

B: Septum

C: CO₂-Falle mit Ethanolamin
(25% in Ethanol)

D: Belüftungsrohr

Reaktionsansatz: Versuch A

0,2 ml ¹⁴C-Glykolat (1,14 µmol = 0,37 MBq)

1,8 ml Aufschlußpuffer (siehe Kap. 4)

+ 3 mg MgCl₂/ml

2,0 ml Peroxisomenfraktion

Versuch B

0,2 ml ¹⁴C-Glykolat (1,14 µmol = 0,37 MBq)

1,6 ml Aufschlußpuffer + 3 mg MgCl₂/ml

0,2 ml Acetyl-CoA (2,5 mg/ml)

2,0 ml Peroxisomenfraktion

Vor Versuchsbeginn wurde das Glykolat zusammen mit dem Puffer 15 Minuten mit CO₂-freier Luft begast, um gasförmige Verunreinigungen aus der Lösung zu entfernen. Unmittelbar nach Zugabe der Peroxisomenfraktion sowie nach 15 und 30 Minuten wurde je 1 ml Probe entnommen und wie im Kapitel 2.c beschrieben weiter aufgearbeitet.

Ein Aliquot (10 µl) der gereinigten Probe wurde anschließend auf die HPLC-Säule gegeben, das Eluat in 120 µl-Fractionen aufgefangen und die Radioaktivität jeder Fraktion gemessen.

Nach 30 Minuten wurde der verbleibende Reaktionsansatz (1 ml) mit 5 ml Citrat-Puffer (0.1 M, pH 2.1) angesäuert und freiwerdendes Kohlendioxid in Ethanolamin-Lösung (s. oben) aufgefangen.

^{14}C -markierte Proben wurden mit entsprechenden Mengen Scintillationsflüssigkeit versetzt und die Radioaktivität im Scintillationszähler gemessen.

4. Herstellung des Zellextraktes

5-10 g der geernteten Algen wurden mehrmals mit Kaliumphosphatpuffer, 0.1 M, pH 7.5 gewaschen und mit einer äquivalenten Menge Aufschlußpuffer (50 mM Tricin-Puffer, pH 8.0, 10mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM Na-EDTA) versetzt.

Der Zellaufschluß erfolgte bei der Alge *Vaucheria* durch Zerschneiden der Fäden in kleine Segmente und anschließendem Homogenisieren in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator.

Die vier anderen Xanthophyceen-Arten wurden mit 20-30 ml Glasperlen (0.5 mm) im Virtis-Homogenisator aufgeschlossen. Große Zelltrümmer wurden anschließend durch eine kurze Zentrifugation (5-10 Minuten bei 1000 xg) aus dem Homogenat entfernt und der Überstand entweder für den Nachweis membrangebundener Enzyme (z.B. Carnitin-Acetyltransferase) direkt verwendet oder aber nochmals 30 Minuten bei 40000 xg zentrifugiert. Der Überstand dieses Zentrifugationsschrittes wird im folgenden als partikelfreier Zellextrakt bezeichnet.

5. Enzymanreicherung und Reinigung

Zur Enzymanreicherung wurde einem partikelfreien Zellextrakt unter ständigem Rühren Protaminsulfat (Endkonzentration: 1 mg pro ml) zugefügt, 10 Minuten im Eisbad gerührt und anschließend 30 Minuten bei 25000 xg zentrifugiert. Die Ammonium-

sulfat-Fällung erfolgte durch langsame Zugabe von gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung zum gelblich-braun gefärbten Überstand bei 0°C, jeweils bis zur erforderlichen Endkonzentration. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 25000 xg wurde das Präzipitat jedes Fällungsschrittes in 2 ml Kaliumphosphat-Puffer, 0.1 M, pH 8.0 gelöst, über Nacht gegen Kaliumphosphat-Puffer, 10 mM, pH 8.0 dialysiert und anschließend zur Bestimmung der Enzymaktivität verwendet.

Die Fällung der Carnitin-Acetyltransferase und deren Reinigung mittels Chromatographie an DEAE-Sephadex erfolgte in Anlehnung an die Methode von CHASE (1969).

6. Isolierung von Zellorganellen mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation

a) Aufschlußmethode für Bumilleriopsis, Heterococcus, Tribonema und Botrydium:

Nach mehrmaligem Waschen wurde das Algenmaterial (4-6 g) jeweils für 10 Minuten in 5, 10 und 16 %iger Saccharose-Lösung (in Aufschlußpuffer) bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den so vorbehandelten Algen wurden je nach Materialmenge 15-25 ml des folgenden Aufschlußmediums gegeben und 5 Minuten im Eisbad gerührt.

Zusammensetzung des Aufschlußmediums:

- 30 ml Aufschlußpuffer (siehe Kap. 4)
- 6 g Saccharose $\hat{=}$ 16.5 % w/w
- 15 mg Dithiothreitol
- 30 mg Cystein
- 100 mg Serumalbumin (BSA)
- 200 mg Polyclar AT (unlösliches Polyvinylpyrrolidon)

(Bei Verwendung eines PERCOLL-Gradienten erfolgte die Vorinkubation in 5 und 10%iger Saccharose-Lsg.; dem Aufschlußmedium wurde 3.6 g Saccharose pro 30 ml zugefügt)

Das Aufbrechen der Zellen erfolgte je nach Organismus entweder im Potter-Elvehjem-Homogenisator (Botrydium) oder, nach Zugabe von 20-30 ml Glasperlen (0.5 mm), im Virtis-Homogenisator. Das Homogenat wurde anschließend in ein 100 ml-Zentrifugenglas gegeben und 10 Minuten bei 500 xg zentrifugiert. Nach dem vorsichtigen Überführen des Überstandes in ein 12ml-Zentrifugenglas wurde erneut 10 Minuten bei 750 xg zentrifugiert und der Überstand auf einen linearen Dichtegradienten geschichtet.

Nach einer 4-stündigen Zentrifugation bei 65000 xg und 4°C wurde der Gradient durch Unterschichten mit 65%iger Saccharose-Lösung aus dem Zentrifugenbecher entfernt und in 2 ml-Fraktionen aufgefangen.

b) Aufschlußmethode für Vaucheria:

4-8 g Algenmaterial wurden jeweils 20 Minuten in 0.4 M und 0.7 M Mannit-Lösung (in Aufschlußpuffer, Kap. 4) bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 Minuten ins Eisbad gestellt. Der Zellaufschluß erfolgte, nach Zugabe von 5-10 ml Aufschlußmedium (s.u.), durch sorgfältiges Zerkleinern mit Rasierklingen in einer Petrischale. Zur Entfernung größerer Zellbruchstücke wurde das Homogenat durch ein 200 µm-Sieb filtriert und das Filtrat 10 Minuten bei 700 xg zentrifugiert. Der hellgrüne Überstand wurde anschließend auf einen linearen Saccharose-Dichtegradienten geschichtet.

(Die Zentrifugation des Gradienten erfolgte entsprechend den Angaben in Kap. 6a).

Zusammensetzung des Aufschlußmediums:

- 30 ml 0.7 M Mannit in Aufschlußpuffer (Kap. 4)
- 15 mg Dithiothreitol
- 30 mg Cystein
- 100 mg Serumalbumin (BSA)
- 250 mg Polyclar AT

c) Herstellung des Saccharose-Dichtegradienten:

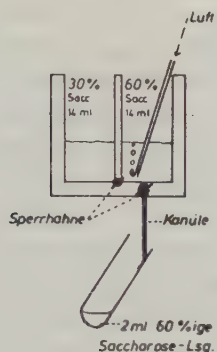


Abbildung 2: Aufbau des Gradientenmischers

Der kontinuierliche, lineare Dichtegradient wurde entsprechend der Abbildung 2 aus einer 60 und einer 30 %igen Saccharose-Lösung mit Hilfe eines Gradientenmischers hergestellt. Die verwendeten Saccharose-Lösungen enthielten den in Kapitel 4 beschriebenen Aufschlußpuffer.

d) Herstellung des PERCOLL-Gradienten:

Zur Herstellung des Dichtegradienten wurden in ein 35 ml-Zentrifugenbecher folgende PERCOLL-Lösungen übereinander geschichtet: 8 ml 60%, 10 ml 45%, 8 ml 27% und 6 ml 21% (v/v). Um die angegebenen PERCOLL-Konzentrationen zu erhalten, wurde die Stammlösung mit 8.6%iger Saccharose-Lösung (+ 0.2% BSA in Aufschlußpuffer, Kap. 4) verdünnt. Der Gradient wurde ohne weitere Vorbehandlung zur Organelltrennung verwendet und 30 Minuten bei 13000 xg zentrifugiert.

(Für Kapitel 4 - 6 : Alle Arbeitsschritte während und nach dem Aufbrechen der Zellen wurden bei einer Temperatur von 0-4 C° durchgeführt; die dabei verwendeten Gefäße und Lösungen waren jeweils vorgekühlt.)

7. Bestimmung der Photosyntheseleistung

Die Messung der Photosyntheserate von *Vaucheria* erfolgte, jeweils bei einem Sauerstoffsättigungsgrad von etwa 50 %, in einer Rank-Elektrode. Da sich die Zellfäden sehr häufig um den Magnetrührstab der Elektrode wickelten, diente statt dessen ein Rührmotor zur Umwälzung. Die Welle des Rührmotors wurde dazu durch die Bohrung des Stopfens geführt. Als Lichtquelle diente eine Halogenlampe (150 W).

Bestimmung der Photosyntheserate von luft-adaptierten *Vaucheria* nach Zugabe von Bicarbonat:

Das Medium V_E wurde für diesen Versuch mit 40 mg Natriumhydrogencarbonat pro Liter versetzt, mit 2.5 mM Tris-HCl auf pH 7.8 eingestellt und zur Kultur von *Vaucheria* verwendet (5 Tage Begasung mit 0.03 Vol. % CO_2). Anschließend wurde die Photosyntheserate der Algen in diesem Medium bestimmt. Als Blindwert diente die Photosyntheseleistung eines mehrfach mit der Nährlösung V_E gewaschenen Aliquots der luft-adaptierten Algen in bicarbonat-freiem Medium.

8. Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie

Das zu untersuchende Algenmaterial wurde mehrmals mit Kaliumphosphat-Puffer, 50 mM, pH 7.2, gewaschen, 90 Minuten in 3 % Glutaraldehyd/Phosphatpuffer bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mehrmals mit Puffer gewaschen. Nach einer einstündigen Fixierung mit OsO_4 (2 % in Phosphatpuffer) bei Raumtemperatur erfolgte die Entwässerung mit Ethanol und Einbettung in Epoxy-Harz (Standardgemisch) nach SPURR (1969). Zur Präparation von *Vaucheria* wurden alle Lösungen bis zur OsO_4 -Fixierung mit 1.5 % NaCl versetzt.

Ultradünnschnitte der Proben wurden mit Bleicitrat und Uranylacetat (REYNOLDS 1963) kontrastiert und auf unbefilmte Kupfernetze aufgezogen.

Die Einbettung einer peroxisomen-haltigen Gradientenfraction wurde in Anlehnung an die Methode von BIEGLMAYER et al. (1973) durchgeführt:

Zunächst wurden 2 ml der Peroxisomenfraction nach und nach mit 2 ml Glutaraldehyd-Lösung (12 % Glutaraldehyd in 40%iger Saccharose-Lösung) versetzt und eine Stunde bei 4°C fixiert. Nach einer 45-minütigen Zentrifugation bei 38 000 xg wurde der Rückstand zweimal mit 0.4 M Saccharose-Lösung (in 50 mM Cacodylat-Puffer, pH 6.8) gewaschen und anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur mit 2 % OsO₄ (in Cacodylat-Puffer) fixiert. Die Entwässerung, Einbettung und Kontrastierung wurde wie bereits oben beschrieben durchgeführt.

Der cytochemische Nachweis der Carnitin-Acetyltransferase erfolgte entsprechend den Angaben von LEWIS & KNIGHT (1977):

Für diesen cytochemischen Nachweis wurden die Algen zweimal mit Glucose/Maleat-Puffer (s.u.) gewaschen und 15 Minuten in 0.6% Kaliumferricyanid (in Puffer) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Material erneut mehrmals mit Glucose/Maleat-Puffer gewaschen und in folgendem Medium eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Zusammensetzung des Inkubationsmediums:

- 5 ml Puffer (250 mM Glucose + 50 mM Natriumhydrogenmaleat,
mit NaOH auf pH 7.0 eingestellt)
- 10 mg Kaliumferricyanid
- 5 mg Uranyl-Acetat
- 4 mg Acetyl-CoA
- 8 mg DL-Carnitin (in der Blindprobe fehlend)

Die Fixierung und Einbettung erfolgte nach der oben beschriebenen Methode.

III. E R G E B N I S S E

1. Kultur der Algen

Wie bereits berichtet wurde, wächst *Bumilleriopsis filiformis* in anorganischer Nährlösung relativ schnell (Generationszeit: 14h), wobei auch Lichtstärken von 15 - 20 KLux über mehrere Tage toleriert werden (HESSE 1974). Entgegen den Beobachtungen von HESSE lag die optimale Anzuchtstemperatur der Alge jedoch unter 23°C.

Die fädigen Xanthophyceen *Heterococcus crassulus* und *Tribonema aequale* weisen ebenfalls eine hohe Wachstumsrate auf und lassen sich auch bei etwas höheren Temperaturen (bis 27°C) kultivieren.

Die Alge *Botrydium granulatum* kann in der beschriebenen Durchlüftungskultur problemlos angezogen werden, im Vergleich zu den vorgenannten Arten ist die Wachstumsrate jedoch etwas geringer.

Da zu Beginn dieser Arbeit keine Reinkultur einer marinen Xanthophyceen-Art zur Verfügung stand, wurden Proben einer an der deutschen Nordseeküste vorkommenden *Vaucheria*-Art gesammelt. Durch die ausgeprägte Verflechtung der Alge mit dem Wattsediment (Tafel 1a und b) war eine mechanische Reinigung des Materials notwendig, die jedoch zu einer irreparablen Schädigung der außergewöhnlich zarten Zellfäden führte. Aus diesem Grund wurde auf die direkte Verwendung des Freilandmaterials für die biochemischen Versuche verzichtet und statt dessen versucht, die Alge unter Laborbedingungen anzuziehen. Um möglichst reines Ausgangsmaterial zu erhalten, wurden die gesammelten Algenproben zunächst für einige Tage in einer Klimakammer bei Dauerlicht gehalten, wodurch sich die Zellfäden sehr schnell zu der darüber befindlichen Lichtquelle aufrichteten (Tafel 2a). Erst danach wurden längere Faden-segmente abpräpariert und in einer Nährlösung weiter kultiviert. Die Algen entwickelten sich jedoch nur langsam, da sich in der Nährlösung rasch Blaualgen und Bakterien aus-

breiteten.

Um axenische Reinkulturen zu gewinnen, wurde anfangs der Versuch unternommen, vegetative Fortpflanzungsstadien der Schlauchalge zu isolieren. Die Bildung dieser sogenannten Brutkeulen konnte bei Agarkulturen der *Vaucheria*-Art problemlos durch eine Trockenstreß- und anschließender Überflutungsphase in großer Zahl induziert werden (Tafel 2b).

Die abgegliederten Brutkeulen wurden mit Hilfe einer dünn ausgezogenen Pasteurpipette unter einem Stereomikroskop gesammelt, mehrmals mit steriler Nährlösung gewaschen und in Flüssigkultur gebracht. Innerhalb weniger Tage keimten die Brutkeulen in der verwendeten Nährlösung aus und wuchsen schnell zu verzweigten Zellfäden heran. Es zeigte sich jedoch, daß mit dieser Methode epiphytische Begleitorganismen nicht entfernt werden konnten.

Ein von ÅBERG & FRIES (1976) beschriebenes Verfahren erwies sich schließlich für die Gewinnung von axenischen Reinkulturen als geeignet. Bei dieser Methode wird durch einseitige Belichtung einer Agarkultur erreicht, daß die *Vaucheria*-Fäden in den Agar hineinwachsen. Da die Schlauchalge ausschließlich apikales Wachstum zeigt, werden die Begleitorganismen nicht mit in die Agarschicht hineingeschleppt und bleiben an der Oberfläche zurück. Die axenischen Spitzenabschnitte können dann unter sterilen Bedingungen aus dem Agar herauspräpariert und weiter kultiviert werden.

Eine ausreichende Wachstumsrate der isolierten *Vaucheria*-Art konnte nur bei Verwendung eines angereicherten Seewassermediums mit einem Salzgehalt von 1,7 ‰ erhalten werden (Tafel 3b). In verschiedenen synthetischen Seewasser-Nährmedien z.B. ASP-6 (McLACHLAN 1964), X 0-1 (CATTOLICO et al. 1976), modifizierte Nährlösung nach MÜLLER (TRAINOR 1978) oder nach JONES et al. (1963) wurde lediglich ein geringes Wachstum der Alge beobachtet. Um Anhaltspunkte über geeignete Licht- und Temperaturbedingungen für die Kultur von *Vaucheria* zu erhalten, wurde die Photosyntheserate der Alge bei verschiedenen Temperaturen und Lichtstärken gemessen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 3 dargestellt.

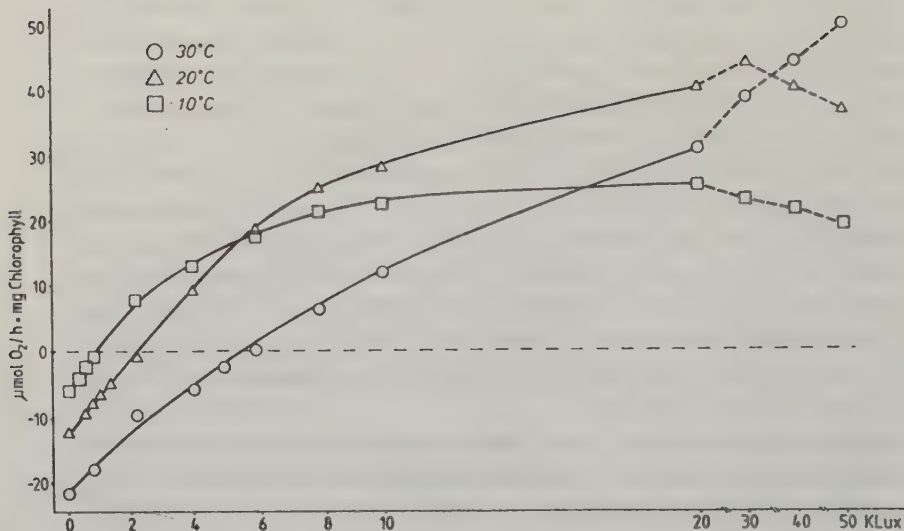


Abbildung 3: Photosyntheserate von *Vaucheria* bei verschiedenen Lichtstärken und Temperaturen

Die maximale Photosyntheserate konnte bei einer Temperatur von 30°C und einer Lichtstärke von 50 KLux gemessen werden. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß diese Bedingungen von der Alge über längere Zeit toleriert werden können.

Wie aus Abbildung 3 hervorgeht, wird die Photosyntheseleistung von *Vaucheria* bei einem geringen Lichtangebot durch niedrige Temperaturen begünstigt. Die Anzucht dieser Alge erfolgte daher bei einer Lichtstärke von 8000 Lux und einer Temperatur von 18–20°C.

Die Fähigkeit vieler Meeresalgen Bicarbonat als C-Quelle zu nutzen (HOOD & PARK 1962), konnte bei *Vaucheria* nicht festgestellt werden, da eine mit 0.03 Vol.-% CO₂ angezogene Kultur keine gesteigerte Photosyntheserate nach Zugabe von Natriumhydrogencarbonat aufwies.

2. Ultrastrukturelle Untersuchung der Algen

Um Aufschluß über das Vorkommen, die Anzahl und Form der Microbodies zu erhalten, wurden die verschiedenen Xanthophyceen zunächst ultrastrukturell untersucht.

Im Hinblick auf die Form und Struktur der einzelnen Zellorganellen sind bei den fünf Xanthophyceen im elektronenmikroskopischen Bild große Ähnlichkeiten erkennbar.

Die meist linsenförmig gestalteten Chloroplasten weisen die für Heterokontophyta typische Thylakoid-Anordnung auf und sind von einer Zisterne des Endoplasmatischen Retikulums umschlossen (Tafel 8b und 9b). In einigen Fällen war auch das, von FALK & KLEINIG (1968) als periplastidäres Retikulum bezeichnete, tubuläre Gebilde zwischen ER-Zisterne und Chloroplastenmembran sichtbar (Tafel 10a und 10b).

Bei allen fünf Arten konnten Vesikel mit einem völlig homogenen Inhalt beobachtet werden, die als Lipidkörper anzusprechen sind (Tafel 4b und 5a).

In engem Kontakt mit den Lipidtröpfchen waren mehrfach die mit tubulären Sacculi ausgestatteten Mitochondrien zu erkennen (Tafel 5a).

Cytosomen, wie sie von FALK & KLEINIG (1968) bei *Tribonema* beobachtet wurden, traten bei den untersuchten Xanthophyceen häufig auf und ließen sich aufgrund ihrer morphologischen Merkmale eindeutig als Microbodies identifizieren. Das zahlenmäßige Verhältnis der im Ultradünnschnitt beobachteten Mitochondrien und Microbodies ist bei den fünf Xanthophyceen-Arten relativ konstant und wird auf etwa 6 : 1 geschätzt.

Die gewöhnlich oval bis langgestreckt erscheinenden Microbodies der untersuchten Xanthophyceen weisen ausnahmslos eine feingranuläre Matrix auf, die sich im elektronenmikroskopischen Bild nach Glutaraldehyd/ OsO_4 -Fixierung deutlich vom umgebenden Cytoplasma abhebt. Eine Assoziation dieser Organellen mit den Chloroplasten und Mitochondrien konnte bei vier der untersuchten Arten festgestellt werden.

Die etwa $0.4 \times 0.9 \mu\text{m}$ großen Microbodies aus *Vaucheria* weisen in den meisten Fällen eine enge topographische Beziehung zu den Chloroplasten und ER-Abschnitten auf (Tafel 4b, 5a und b). Durch die enge Beziehung zum Chloroplasten erscheinen die Microbodies im Anschnitt oft einseitig abgeplattet (Tafel 4b).

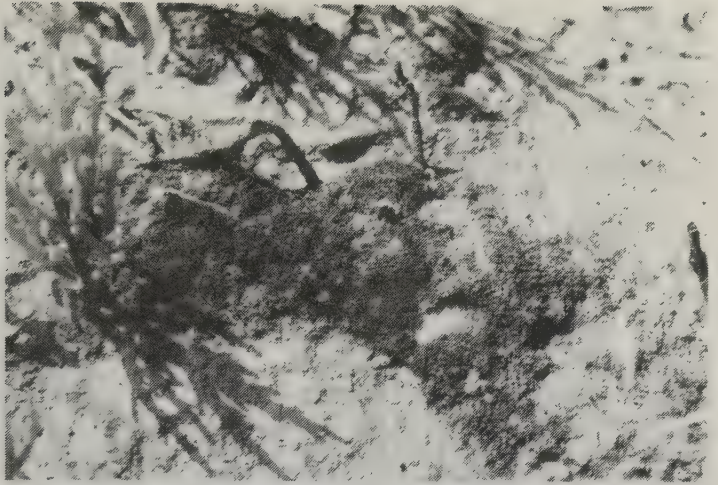
In der ebenfalls siphonalen Alge *Botrydium* sind die Microbodies im Durchschnitt etwa $0.4 \times 0.5 \mu\text{m}$ groß und lassen häufig eine Assoziation mit Mitochondrien und Chloroplasten erkennen (Tafel 6a und b).

Die schon von FALK & KLEINIG (1968) bei *Tribonema* festgestellte enge topographische Beziehung zwischen Mitochondrien und Microbodies (Cytosomen) konnte durch eigene Beobachtungen bestätigt werden (Tafel 7a und b). In einigen Fällen waren die etwa $0.4 \times 0.6 \mu\text{m}$ großen Microbodies außerdem mit Chloroplasten und ER-Segmenten assoziiert.

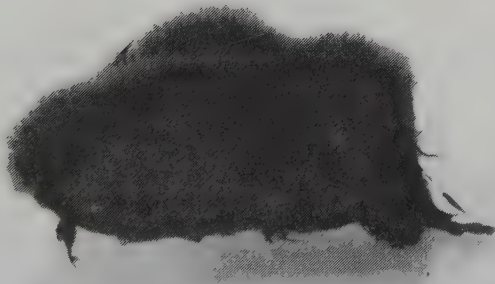
Ebenso wie bei *Tribonema* lassen auch die Microbodies von *Heterococcus* eine Assoziation mit den Mitochondrien und in geringerem Maße mit den Chloroplasten erkennen. Diese drei Organellen liegen in einigen Fällen so dicht nebeneinander, daß die Microbodies im Anschnitt eine verformte Gestalt aufweisen (Tafel 8b). Im Vergleich zu den anderen Arten sind die Microbodies von *Heterococcus* mit $0.3 \times 0.4 \mu\text{m}$ relativ klein und sind im Anschnitt ausschließlich rund bis oval geformt (Tafel 8a).

Die Microbodies von *Bumilleriopsis* sind im Durchschnitt ca. $0.3 \mu\text{m}$ breit, ihre Länge kann jedoch bis zu $1.6 \mu\text{m}$ betragen (Tafel 9a). Eine topographische Beziehung dieser Organellen zu Chloroplasten und Mitochondrien ist bei *Bumilleriopsis* nicht so ausgeprägt wie bei den anderen beschriebenen Xanthophyceen (Tafel 9b und 10a).

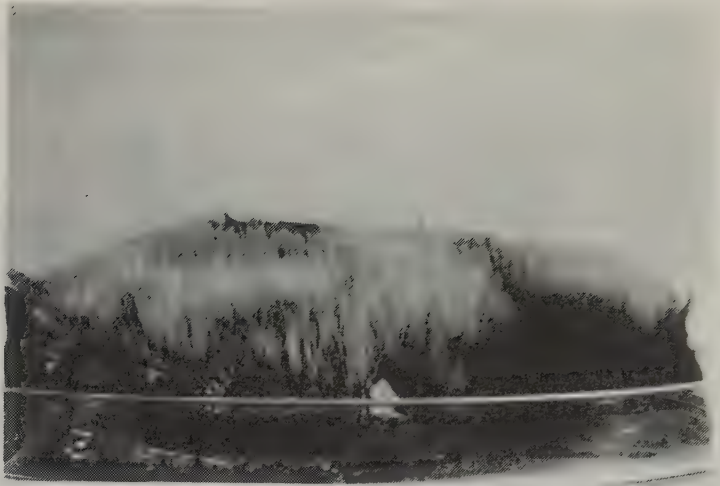
In einigen wenigen Fällen konnten bei dieser Alge in der Microbody-Matrix Einschlüsse beobachtet werden (Tafel 10c), die mit denen in den Microbodies höherer Pflanzen vergleichbar sind (z.B. THOMAS & TRELEASE 1981).



Tafel 1a: *Vaucheria* am natürlichen Standort im oberen Eulitoral
(Nordseeküste, Jadebusen nahe Schweiburg)



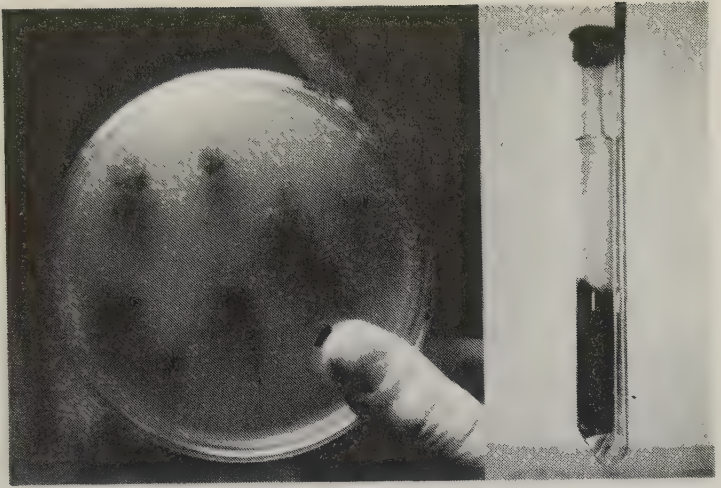
Tafel 1b: Freilandprobe der isolierten *Vaucheria*-Art



Tafel 2a: Freilandprobe von *Vaucheria* nach zweitägiger
Kulturdauer in einer Klimakammer.
(15°C, 100% Luftfeuchtigkeit, 2000 Lux)

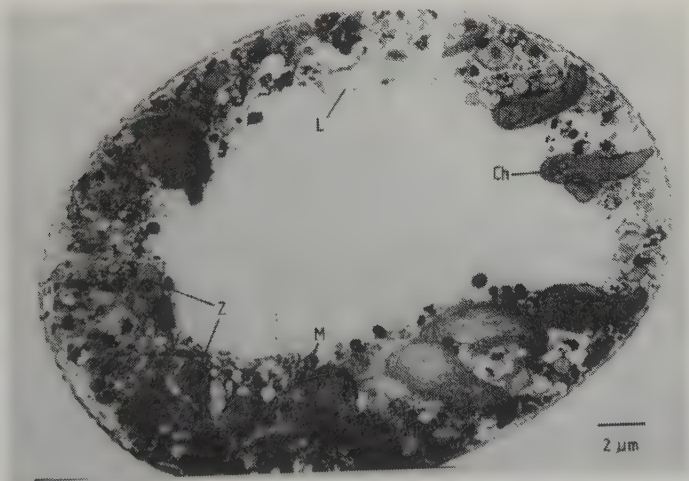


Tafel 2b: Auskeimende Brutkeule der isolierten *Vaucheria*-Art.
(Größe der Brutkeule: ca. 50 x 60 µm)

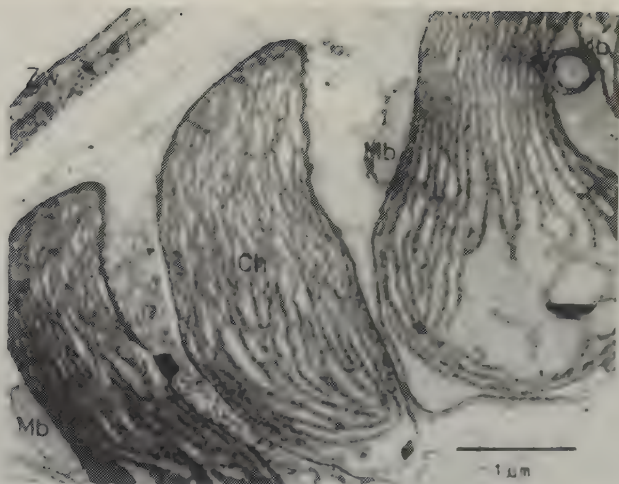


Tafel 3a (links): Agarkultur von *Vaucheria spec.*

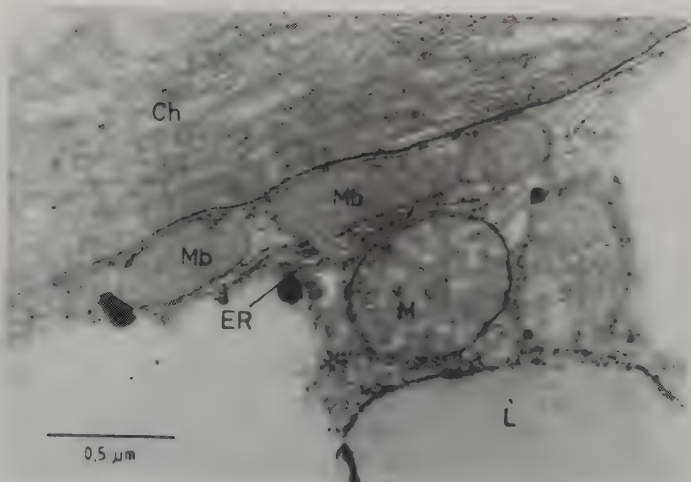
Tafel 3b: *Vaucheria* in Durchlüftungskultur.



Tafel 3c: Querschnitt eines Zellfadens von *Vaucheria*.
 (Z = Zellkern; M = Mitochondrium; Ch = Chloroplast;
 L = Lipidkörper)

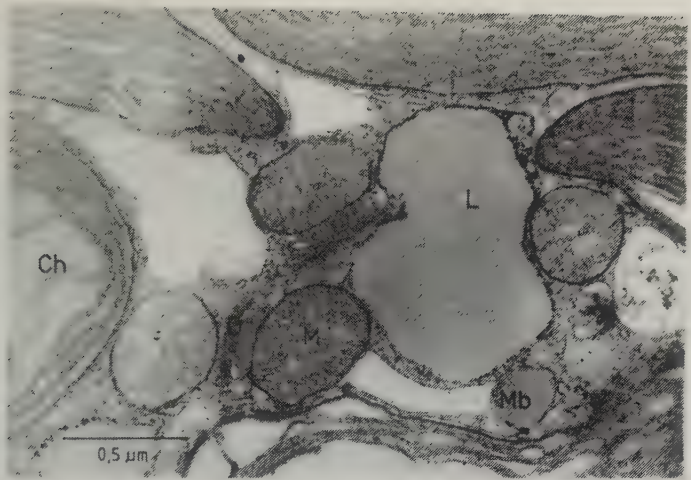


Tafel 4a: Chloroplast-Microbody-Assoziation in *Vaucheria*.

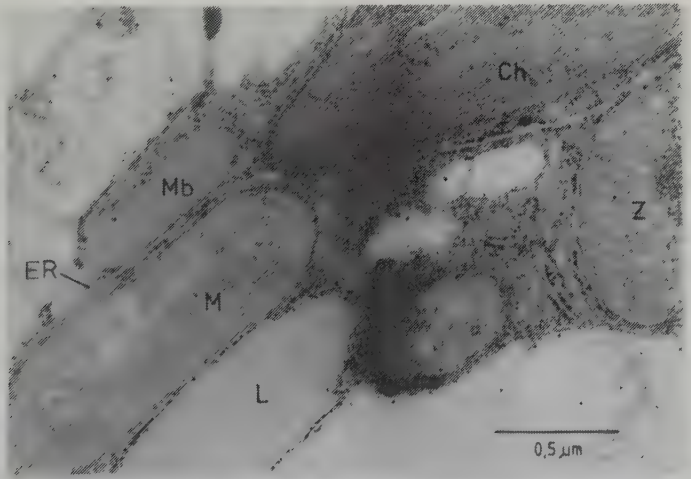


Tafel 4b: Microbodies in *Vaucheria*. Assoziierung mit Chloroplast und ER-Segmenten.

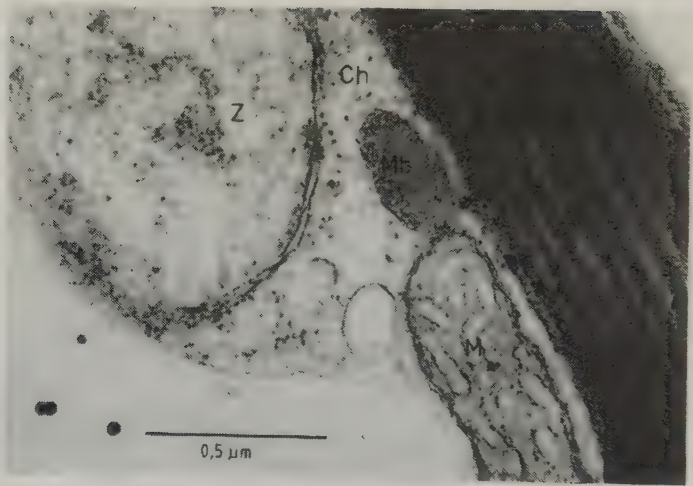
(M = Mitochondrium; Ch = Chloroplast; Mb = Microbody;
L = Lipidkörper; Zw = Zellwand)



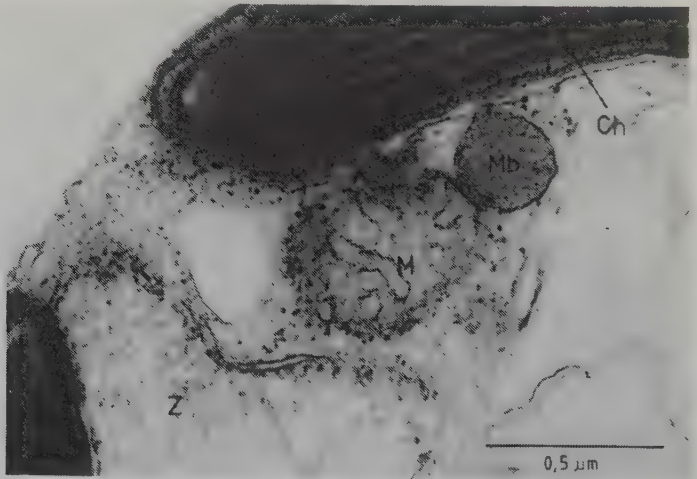
Tafel 5a: Assoziation von Mitochondrien mit Dictyosomen und einem Lipidkörper in *Vaucheria*.



Tafel 5b: Anschnitt eines langgestreckten Microbody in *Vaucheria*.
 (Z = Zellkern; M = Mitochondrium; Ch = Chloroplast;
 Mb = Microbody; D = Dictyosom; L = Lipidkörper)

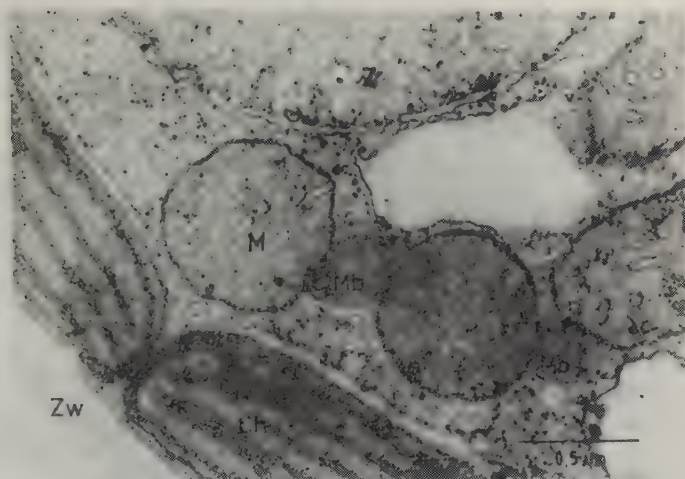


Tafel 6a: Microbodies in *Botrydium granulatum*.
Assoziierung mit Chloroplast und Mitochondrium.

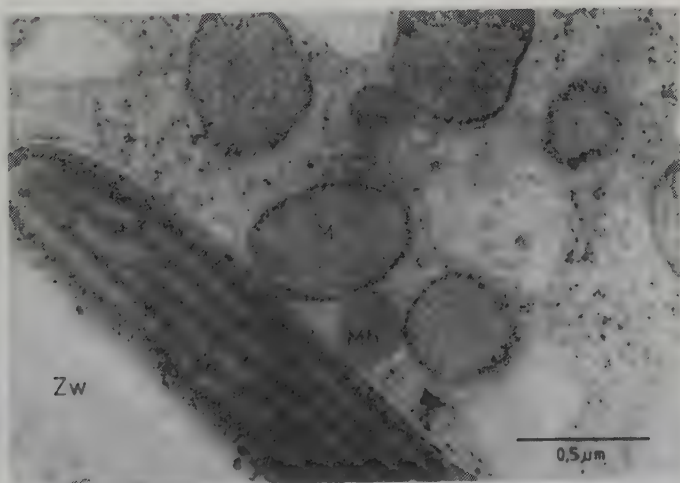


Tafel 6b: Typische topographische Lage eines Microbody in
Botrydium granulatum.

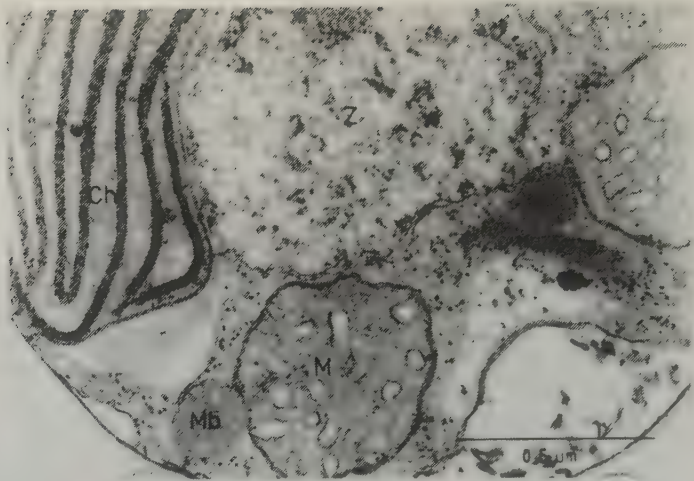
(Z = Zellkern; M = Mitochondrium; Ch = Chloroplast;
Mb = Microbody)



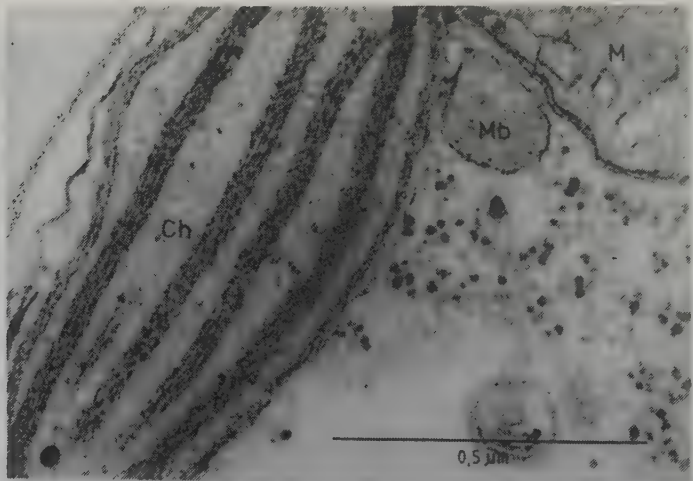
Tafel 7a: Microbodies in *Tribonema aequale*.
Assoziierung mit Mitochondrien.



Tafel 7b: Microbodies in *Tribonema aequale*.
Assoziierung mit Chloroplast und Mitochondrien.
(Z = Zellkern; M = Mitochondrium; Ch = Chloroplast;
Mb = Microbody; Zw = Zellwand)



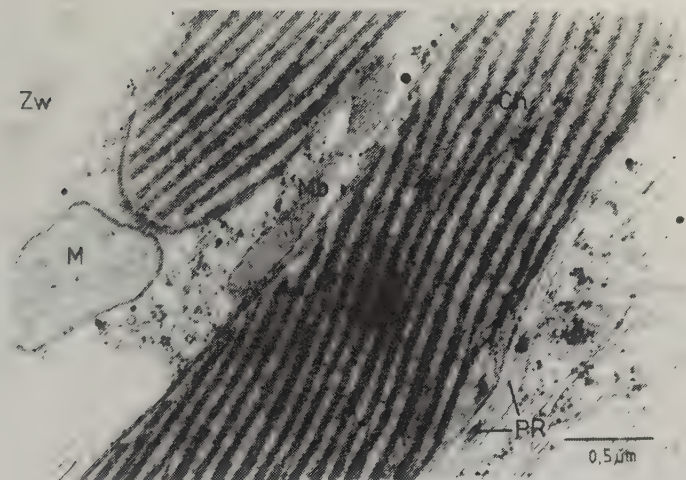
Tafel 8a: Microbodies in einer Zoospore von *Heterococcus*.



Tafel 8b: Microbody in *Heterococcus crassulus*.

Durch die topographische Nähe zu Chloroplast und Mitochondrium verformt erscheinend.

(Z = Zellkern; M = Mitochondrium; Ch = Chloroplast;
Mb = Microbody)



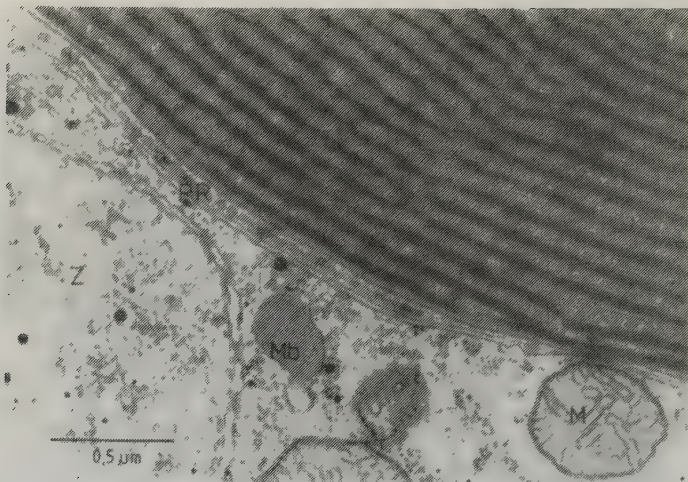
Tafel 9a: Anschnitt eines außergewöhnlich langgestreckten Microbody in *Bumilleriopsis filiformis*.



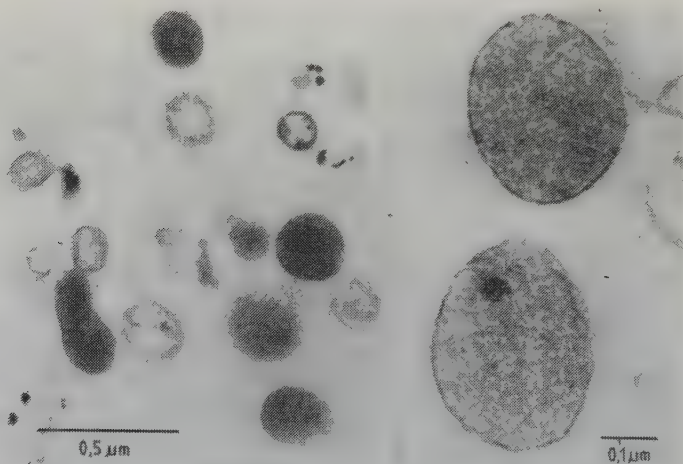
Tafel 9b: Microbody in *Bumilleriopsis filiformis*.

Assoziierung mit ER-Segment.

(Z = Zellkern; M = Mitochondrium; Ch = Chloroplast; Mb = Microbody; PR = Periplastidäres Retikulum; Zw = Zellwand)



Tafel 10a: Periplastidäres Retikulum in Bumilleriopsis.



Tafel 10b: Durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation
isolierte Microbodies aus Bumilleriopsis.
(Rechts: Microbody mit einem amorphen Einschluß)
(Z = Zellkern; M = Mitochondrium; Mb = Microbody;
PR = Periplastidäres Retikulum)

3. Stoffwechselphysiologische Untersuchungen an *Bumilleriopsis filiformis*

a) Nachweis und Charakterisierung von Enzymen des Glykolatstoffwechsels

Wie eingangs erwähnt, wurden in Vorversuchen bereits einige Hinweise auf die Art des Glykolatstoffwechsels bei der coccalen Xanthophyceee *Bumilleriopsis* erhalten (GROSS 1984). Diese Ergebnisse wurden ergänzt und sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1: Nachweis von Enzymen des Glykolatstoffwechsels aus dem partikelfreien Zellextrakt von *Bumilleriopsis*

	nmol/min x mg Protein
Phosphoglykolat-Phosphatase	172.1
Katalase	102.0 x 10 ³
Glykolat-Oxidase	56.0
NAD-abhängige Reduktion von Hydroxypyruvat	0.2

Ein Vergleich der gemessenen Enzymaktivitäten mit denen anderer Algen, die einen peroxisomalen Glykolatstoffwechsel besitzen (STABENAU 1976, STABENAU & SÄFTEL 1981) zeigt deutlich, daß die spezifische Aktivität des hydroxypyruvat-reduzierenden Enzyms außergewöhnlich niedrig ist. Bei der Charophyceee *Mougeotia* z.B. beträgt das Verhältnis der Aktivität der Glykolat-Oxidase und der Hydroxypyruvat-Reduktase etwa 1:6 (STABENAU 1984b), wogegen die bei *Bumilleriopsis* gemessenen Werte ein Verhältnis von 280:1 erkennen lassen. Es erschien daher notwendig, die für diese Aktivitäten verantwortlichen Enzyme eingehender zu charakterisieren.

Tabelle 2: Charakterisierung der Glykolat-Oxidase nach
Anreicherung durch fraktionierte Ammoniumsulfat-
Fällung

Substratspezifität:	Aktivität nmol/min x mg Protein		Produkt bzw. O ₂ -Verbrauch
D-Lactat	0.0	(0.0%)	Pyruvat
L-Lactat	6.3	(4.6%)	Pyruvat
Glykolat	138.2	(100.0%)	Glyoxylat
Glykolat	129.5		H ₂ O ₂
Glykolat	106.5		O ₂ -Verbrauch
Glykolat + 2 mM KCN	139.0	(100.0%)	Glyoxylat
Glyoxylat	42.7	(33.0%)	Oxalat

Nach Lineweaver-Burk ermittelte Konstanten:

K _m (Glykolat)	250 µM	
K _m (Glyoxylat)	7140 µM	
K _i (Oxalat)	670 µM	(für Glykolat als Substrat)

Die in Tabelle 2 aufgeführten Eigenschaften weisen das angereicherte Enzym eindeutig als Glykolat-Oxidase aus, die dem entsprechenden Enzym aus höheren Pflanzen und Charophyceen sehr ähnlich ist (STABENAU 1976, GERHARDT 1978, STABENAU & SÄFTEL 1982).

Tabelle 3: Charakterisierung des Hydroxypyruvat reduzierenden
Enzyms im partikelfreien Zellextrakt

Substrat	Co-Substrat	Produkt	nmol/min x mg Protein	
Glyoxylat	NADH	Glykolat	17.1	(10.2%)
"	NADPH	"	167.8	(100.0%)
Hydroxypyr.	NADH	Glycerat	0.2	(0.1%)
"	NADPH	"	14.4	(8.6%)
Pyruvat	NADH	Lactat	0.0	(0.0%)
"	NADPH	"	0.0	(0.0%)

Wie aus Tabelle 3 zu entnehmen ist, wird bei Verwendung eines partikelfreien Zellextraktes die höchste Aktivität mit Glyoxylat und NADPH als Substrat bzw. Co-Substrat erreicht. Im Vergleich dazu beträgt der Umsatz von Hydroxypyruvat mit NADH als Co-Substrat in der gleichen Probe lediglich 0.1%. Dies legt die Vermutung nahe, daß die gemessene Reduktion von Hydroxypyruvat auf die geringe Substratspezifität der Glyoxylat-Reduktase zurückzuführen ist (vgl. dazu KOHN & WARREN 1970).

Um Aufschluß über die intrazelluläre Lokalisation des hydroxypyruvat-reduzierenden Enzyms zu erhalten, wurden die Organellen aus Bumilleriopsis-Zellen mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation isoliert und anschließend biochemisch charakterisiert.

b) Intrazelluläre Lokalisation verschiedener Enzyme

In Abbildung 4 sind die Ergebnisse einer Zellorganelltrennung mit Hilfe der isopyknischen Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation dargestellt.

Die Verteilungsprofile der Cytochrom-C-Oxidase und der Malat-Dehydrogenase lassen bei der für Mitochondrien typischen Dichte von 1.20 g/cm^3 einen deutlichen "peak" erkennen (Abb. 4b).

Das peroxisomale Leitenzym Katalase erreicht dagegen, zusammen mit der Glykolat-Oxidase und der Glutamat-Glyoxylat-Aminotransferase, die maximale Aktivität bei einer Dichte von 1.22 g/cm^3 (Abb. 4c).

Die Fraktion mit der höchsten Aktivität partikelgebundener Katalase wurde elektronenmikroskopisch untersucht. Dabei ließen sich zahlreiche Strukturen erkennen (Tafel 10b), die morphologisch mit den Microbodies identisch sind, die im

Ultradünnschnitt von Bumilleriopsis-Zellen beobachtet wurden (Kapitel 2).

Wie sich aus dem Profil der Chlorophyll-Verteilung entnehmen läßt, wurden die Mitochondrien und Peroxisomen deutlich von der Chloroplastenfraktion getrennt.

Die für den Umsatz von Serin zu Glycerat verantwortlichen Enzyme des Glykolatstoffwechsels, Serin-Pyruvat- bzw. Serin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase (siehe WINKLER et al. 1982) und Hydroxypyruvat-Reduktase waren dagegen weder in der Peroxisomen- noch in der Mitochondrienfraktion nachzuweisen. Zum einen bestätigen diese Ergebnisse die Annahme, daß für die im Zellextrakt gemessene Hydroxypyruvat-Reduktase-Aktivität eine Glyoxylat-Reduktase verantwortlich ist, zum anderen wird auch deutlich, daß der Glykolatstoffwechsel dieser Alge nicht nach dem von Blatt-Peroxisomen bekannten Schema ablaufen kann.

In den Peroxisomen von Bumilleriopsis konnte darüber hinaus eine geringe Aktivität des Enzyms Uricase nachgewiesen werden.

Eine weitere Besonderheit der Peroxisomen von Bumilleriopsis ist außerdem das Fehlen der β -Oxidation. Die Aktivitätsverteilung von vier charakteristischen Enzymen des Fettsäureabbaus im Dichtegradienten weisen diesen Stoffwechselprozeß eindeutig als Bestandteil der Mitochondrien aus (Abb. 4d und 9c).

Die mitochondriale β -Oxidation unterscheidet sich von dem Fettsäureabbau der Peroxisomen im wesentlichen durch die Art des acyl-CoA-oxidierenden Enzyms. In den Peroxisomen werden die CoA-Ester von einer H_2O_2 -bildenden Oxidase umgesetzt, wogegen die mitochondriale Acyl-CoA-Dehydrogenase die Elektronen vermutlich auf ein Redox-System der Atmungskette überträgt.

Bei der Alge Bumilleriopsis wurde daher untersucht, ob bei der Oxidation von CoA-Estern Wasserstoffperoxid produziert und Sauerstoff verbraucht wird. Aufgrund der negativen Befunde bei diesen Versuchen kann angenommen werden, daß eine Acyl-CoA-Dehydrogenase vorliegt.

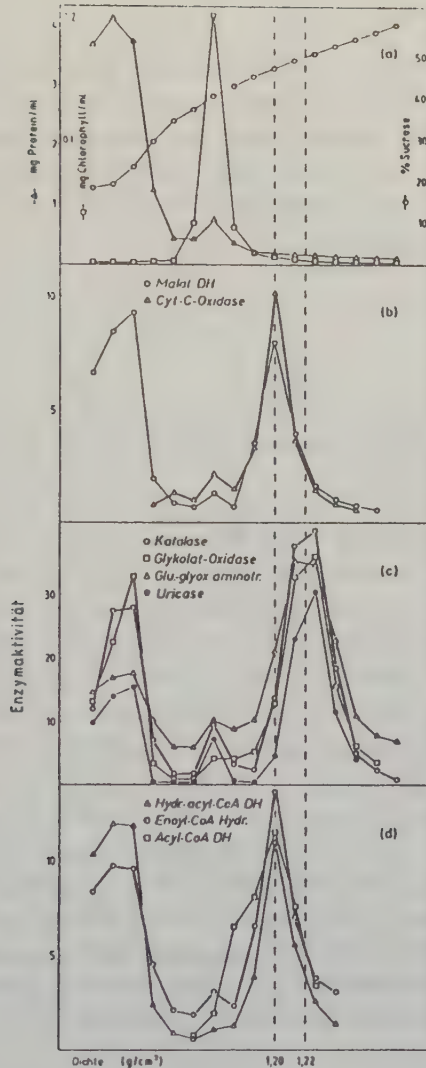


Abbildung 4: Verteilung von peroxisomalen und mitochondrialen Enzymen aus *Bumilleriopsis filiformis* im Saccharose-Dichtegradienten

Enzymeinheiten: Wert der Ordinate x Faktor = nmol/min x ml Fraktion
 (Katalase x 10^3 ; Glykolat-Oxidase x 0.45; Uricase x 0.07; Glutamat-Glyoxylat-Aminotransferase x 2.5; Cytochrom-C-Oxidase x 5; Malat-Dehydrogenase x 100; Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase x 7.5; Enoyl-CoA-Hydratase x 10; Acyl-CoA-Dehydrogenase x 1)

Die oben beschriebenen Ergebnisse machen deutlich, daß bei *Bumilleriopsis* nur ein "unvollständiger" Glykolatstoffwechsel möglich ist. Da eine Ausscheidung von Glykolat oder Glyoxylat in das Nährmedium bei dieser Alge nicht nachgewiesen werden konnte, erschienen Untersuchungen zum weiteren Metabolismus des Glyoxylats notwendig.

c) Mögliche Wege eines Umsatzes von Glyoxylat und deren Überprüfung

- 1.) Die Aminierung von Glyoxylat zu Glycin konnte bereits durch den Nachweis der Glutamat-Glyoxylat-Aminotransferase in den Peroxisomen belegt werden (Abb. 4c); Hinweise auf einen weiteren Umsatz von Glycin zu Serin (Serinhydroxymethyltransferase), Acetat (Glycin-Reduktase), Sarcosin (Glycinmethyltransferase) oder 2-Amino-3-oxobutyrat (Glycinacetyltransferase) wurden nicht erhalten.
- 2.) Die weitere Oxidation zu Oxalat durch die Glykolat-Oxidase ist, wie Abbildung 5 zeigt, ebenfalls möglich. Wird jedoch die geringe Affinität des Enzyms zu Glyoxylat (K_m -Wert: 7.2 mM) berücksichtigt, kann dieser Weg unter normalen Kulturbedingungen allerdings nur eine unbedeutende Rolle spielen (vgl. dazu HUANG et al. 1983).
- 3.) Auch die Kondensation von zwei Molekülen Glyoxylat zu Tartronsäuresemialdehyd durch die Glyoxylat-Carboxyligase, wie sie z. B. aus *Gloeomonas* (BADOIR & WAYGOOD 1971) berichtet wird, konnte nicht nachgewiesen werden.

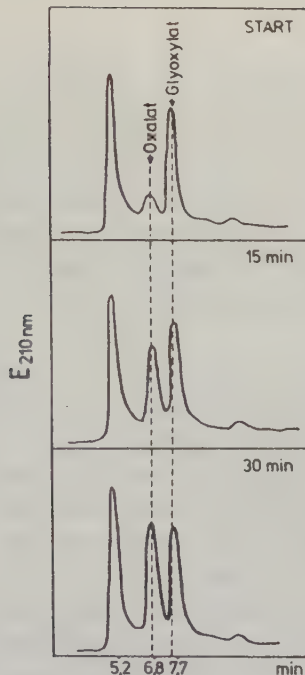


Abbildung 5: Umsatz von Glyoxylat zu Oxalat durch die Glykolat-Oxidase aus *Bumilleriopsis* (Reaktionsansatz (1 ml): 0.1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 8.0; 0.4 ml Glykolat-Oxidase, durch Ammoniumsulfat-Fällung angereichert; 1000 U Katalase; 5 mM Na-Glyoxylat. Unmittelbar nach Versuchsbeginn sowie nach 15 und 30 Minuten wurden Proben entnommen und analysiert. Auftrennung der organischen Säuren mittels HPLC, Laufmittel: 0.1 N H_2SO_4 , Fluß: 0.8 ml/min, Temperatur: 20°C)

- 4.) Der Umsatz von Glyoxylat zu Malat durch das Schlüsselenzym des Glyoxylat-Zyklus, die Malatsynthetase, wurde ebenfalls untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeiten sollen im folgenden näher beschrieben werden.

Im partikelfreien Zellextrakt von *Bumilleriopsis* konnten Enzymaktivitäten gemessen werden, die das Vorkommen der glyoxysomalen Leitenzyme Isocitrat-Lyase und Malatsynthetase vermuten ließen. Die im Isocitrat-Lyase-Test festgestellte Enzymaktivität lag jedoch im Vergleich zu der Aktivität der Malatsynthetase um den Faktor 10 niedriger. Aufgrund dieser Ergebnisse erschien eine eingehendere Untersuchung der beiden Enzymaktivitäten notwendig.

Untersuchungen zum Vorkommen einer Isocitrat-Lyase

Die Aktivität der Isocitrat-Lyase wird bei verschiedenen Grünalgen durch Lichteinwirkung herabgesetzt (HOCK 1969, STABENAU 1969). Dies führte zu der Überlegung, daß die geringe Enzymaktivität im Isocitrat-Lyase-Test bei *Bumilleriopsis* auf die autotrophe Anzucht der Algen zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurde eine Algenkultur ins Dunkle gestellt und die Aktivität sowie die Substrataffinität des Enzyms in bestimmten Zeitintervallen gemessen (Tab. 4).

Tabelle 4: Spezifische Aktivität und Substrataffinität des Isocitrat umsetzenden Enzyms unter verschiedenen Kulturbedingungen

Kulturbedingung:	Spez. Aktivität: (nmol/min x mg Protein)	K_m -Wert für Isocitrat:
8000 Lux	3.28	909 μ M
6 Std. ohne Licht	3.45	800 μ M
15 Std. ohne Licht	3.73	444 μ M
24 Std. ohne Licht	3.70	164 μ M
48 Std. ohne Licht	4.21	109 μ M
72 Std. ohne Licht	4.64	103 μ M

Die Ergebnisse in Tabelle 4 machen deutlich, daß sich die spezifische Aktivität des Enzyms nur unwesentlich ändert, wenn die Algen ohne Licht gehalten werden. Der K_m -Wert für Isocitrat nimmt dagegen bereits nach einer 15-stündigen Dunkelphase um 50% ab und hat nach etwa 48 Stunden seinen geringsten Wert erreicht. Diese Änderung der Enzymkinetik ist der einer kompetitiven Hemmung sehr ähnlich (Abb. 6).

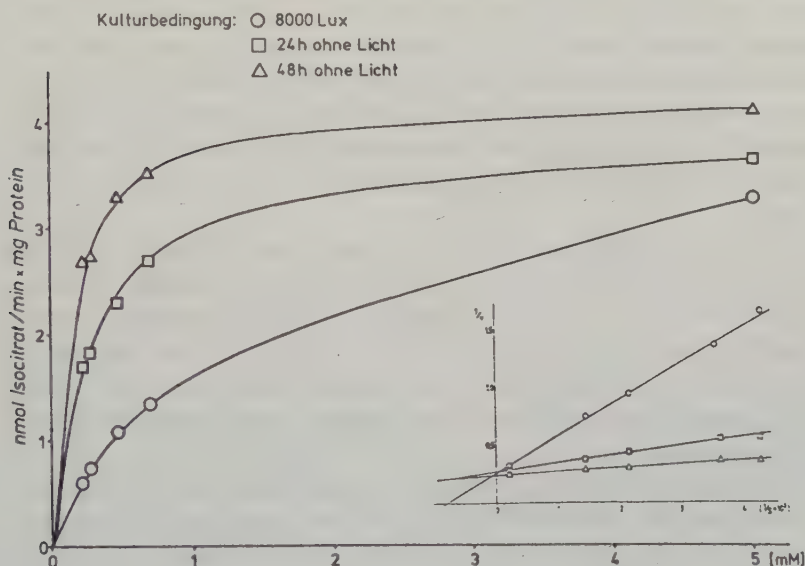


Abbildung 6: Änderung der Reaktionskinetik des isocitrat-umsetzenden Enzyms bei einem Übergang von Licht- zu Dunkelkultur

Da diese Ergebnisse die Einwirkung eines Hemmstoffes bei den Versuchen vermuten ließen, wurden einem Testansatz verschiedene Stoffwechsel-Metabolite zugefügt, die in der Literatur als Inhibitoren der Isocitrat-Lyase beschrieben wurden (FOO et al. 1971). Bei diesen Versuchen konnte eine starke kompetitive Hemmung durch Oxalat festgestellt werden, die bei der Isocitrat-Lyase anderer Organismen bisher nicht in diesem

Umfang beobachtet wurde (Zusammenfassung bei GERHARDT 1978). Die erhaltenen Ergebnisse legten den Gedanken nahe, daß die Substrataffinität des Enzyms durch den Oxalatgehalt der Zelle reguliert wird. In diesem Fall müßte Oxalat bei Belichtung gebildet und im Dunkeln abgebaut werden, wie dies bereits in den Zellen von *Bougainvillea* festgestellt werden konnte (SRIVASTAVA & KRISHAN 1962). Wie aus Abbildung 5 deutlich wird, ist eine Produktion von Oxalat im Zuge des Glykolatstoffwechsel denkbar. Der Abbau des Oxalats könnte durch folgende Enzyme katalysiert werden: Oxalat-Oxidase, Oxalat-Decarboxylase, Oxalyl-CoA-Synthetase oder Oxalat-Acetyltransferase. Bei der Alge *Bumilleriopsis* konnte jedoch weder eine lichtabhängige Änderung des Oxalatgehaltes der Zelle noch das Vorkommen eines oxalat-umsetzenden Enzyms festgestellt werden.

Um eine Hemmung des isocitrat-umsetzenden Enzyms durch Metabolite zu verhindern, wurde der Zellextrakt über Nacht gegen Tris-Puffer, 10mM, pH 7.8, dialysiert. Überraschenderweise hatte jedoch die Dialyse des Zellextraktes einen völligen Aktivitätsverlust des Enzyms zur Folge, der auch durch Zugabe verschiedener Metallionen nicht rückgängig gemacht werden konnte.

Dieser Befund führte zu der Vermutung, daß die im undialysierten Extrakt gemessene Aktivität auf ein Enzym zurückzuführen ist, das einen niedermolekularen Co-Faktor benötigt. Da der verwendete Enzymtest auf dem relativ unspezifischen Nachweis von Ketosäuren basiert, erschien es denkbar, daß durch die Reaktion einer Isocitrat-Dehydrogenase eine Zunahme der 2-Oxoglutarat-Konzentration gemessen wurde.

Aus diesen Überlegungen heraus, wurde einem Testansatz für den Nachweis von Isocitrat-Lyase das Co-Substrat NAD bzw. NADP zugesetzt und die Extinktionsänderung bei 324 nm verfolgt (Abbildung 7). Wie in der Darstellung zu erkennen ist, wird die Extinktionsänderung durch die Zugabe von NAD nicht beeinflusst, wogegen in Anwesenheit von NADP eine erhöhte Extinktionszunahme bei einer Wellenlänge von 324 nm zu verzeichnen ist.

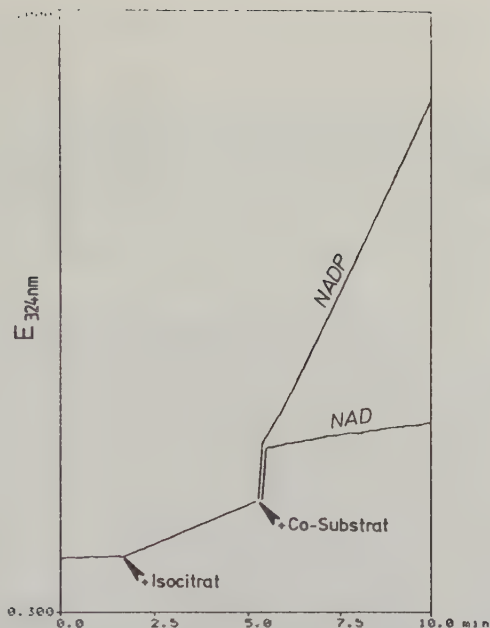


Abbildung 7: Änderung der Extinktionszunahme in einem Testansatz für den Nachweis von Isocitrat-Lyase nach Zugabe von NAD bzw. NADP (0.7 mM)

Dieses Ergebnis führte zu einer zweiten Erklärung für die Änderung der Substrataffinität bei unterschiedlichem Lichtangebot:

Bei Belichtung ist, bedingt durch die Photosynthese, das NADP-Angebot in der Zelle gering, der gemessene K_m -Wert für Isocitrat daher hoch; in Dunkelkulturen liegt dagegen vermutlich nur ein geringer Anteil des NADP in der reduzierten Form vor, so daß in diesem Fall der K_m -Wert deutlich niedriger erscheint.

Ungeklärt bleibt die Ursache für den starken Hemmeffekt von Oxalat, der durch eine steigende NADP-Konzentration kontinuierlich verringert werden kann.

Um zwischen der Aktivität einer Isocitrat-Lyase und der einer Isocitrat-Dehydrogenase eindeutiger differenzieren zu können, wurden die Reaktionsprodukte eines Testansatzes säulen-chromatographisch aufgetrennt und analysiert (Abb. 8). Eine Bildung von Glyoxylat oder Succinat konnte, im Gegensatz zu 2-Oxoglutarat, in diesem Versuchsansatz nicht nachgewiesen werden, so daß das Vorkommen einer Isocitrat-Lyase bei Bumilleriopsis ausgeschlossen werden kann.

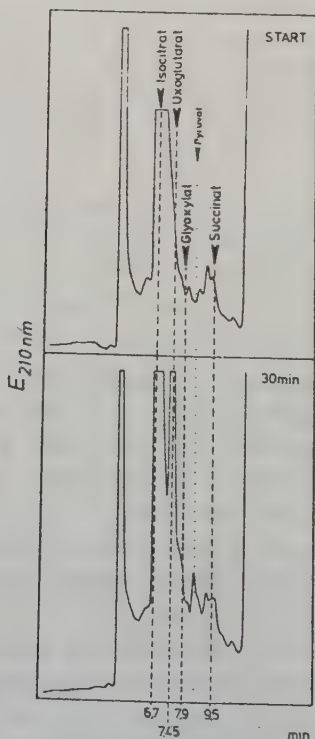


Abbildung 8: Enzymatischer Umsatz von Isocitrat in einem partikelfreien Zellextrakt von Bumilleriopsis

(Reaktionsansatz (1 ml): 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM $MgCl_2$, 0.5 ml Zellextrakt, 3 mM Na-DL-Isocitrat. Unmittelbar nach Zugabe von Isocitrat sowie nach 30 min wurden Proben entnommen und analysiert. Auftrennung der organischen Säuren mittels HPLC, Laufmittel: 30 mM H_2SO_4 , Fluß: 0.8 ml/min, Temperatur: 65°C)

Tabelle 5: Charakterisierung der Malatsynthetase nach
Anreicherung durch fraktionierte Ammoniumsulfat-
Fällung

Anreicherungsfaktor	3.5
pH-Optimum	8.0 - 8.5
Nach Lineweaver-Burk ermittelte Konstanten:	
K_m (Acetyl-CoA)	3.6 μM
K_m (Glyoxylat)	62.0 μM
K_i (Oxalat)	6.6 μM (kompetitiv)
K_i (Glykolat)	24.0 μM (kompetitiv)

Das angereicherte Enzym ist aufgrund der erhaltenen Ergebnisse (Tab. 5) eindeutig als Malatsynthetase anzusprechen, obwohl die Affinität des Enzyms zu Acetyl-CoA sowie die Hemmbarkeit durch Oxalat und Glykolat stärker ausgeprägt ist als bei anderen bisher untersuchten Objekten (DIXON & KORNBERG 1962, BOWDEN & LORD 1978).

Wie die Ergebnisse einer Zellorganelltrennung mittels isopyknischer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation in Abbildung 9 zeigen, liegt die höchste Aktivität der Malatsynthetase in der Peroxisomenfraktion vor. Auch eine Trennung der Zellorganellen mit Hilfe der Geschwindigkeitszentrifugation (Abb. 10) weist dieses Enzym als Bestandteil der Glykolat-Oxidase und Katalase haltigen Partikel aus. Dies legt den Gedanken nahe, daß durch die Oxidation der Glykolsäure das Substrat für die Malatsynthetase geliefert wird.

Da in diesen Organellen offensichtlich keine Quelle für Acetyl-CoA vorhanden ist, stellt sich die Frage, woher das für die Malatsynthese notwendige Acetyl-CoA stammt.

d) Carnitin-Acetyltransferasen als Transportsystem für Acetyl-CoA

Der Hauptbildungsprozeß für Acetyl-CoA ist, neben der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat, die β -Oxidation, die bei der Xanthophyceen *Bumilleriopsis* in den Mitochondrien abläuft, so daß das Acetyl-CoA für die Malat-Synthese mit großer Wahrscheinlichkeit aus diesen Organellen stammt.

Der Transport der aktivierten Essigsäure vollzieht sich in pflanzlichen Zellen nach bisherigen Vorstellungen mit Hilfe eines Citrat-Malat-Shuttles (RICHTER 1982). Dieser Transportweg besitzt jedoch nur eine relativ geringe Umsatzrate, da die Aktivität des Schlüsselenzyms Citratsynthetase durch den ATP-Spiegel in den Mitochondrien reguliert wird (AXELROD & BEEVERS 1972).

Ein zweiter Transportmechanismus für Acetyl-CoA wird insbesondere für tierische Zellen postuliert, bei dem das Acetyl-CoA mit Hilfe einer Carnitin-Acetyltransferase in den Carnitinester umgewandelt wird und so für die Mitochondrienmembran permeabel ist (BRESSLER 1970).

Bei entsprechenden Untersuchungen an isolierten Organellen von *Bumilleriopsis* konnte eine relativ hohe Aktivität von Carnitin-Acetyltransferase in der Peroxisomenfraktion verzeichnet werden (Abb. 9d).

Da in der Literatur Berichte über eine Aktivitätssteigerung von Carnitintransferasen nach Zugabe von Detergenzien vorliegen (BIEBER et al. 1972, HALPERIN & PANDE 1979), wurden die Gradientenfraktionen mit Digitonin inkubiert und anschließend für den Transferase-Test verwendet. Das Aktivitätsmaximum konnte nach der Vorinkubation mit Digitonin überraschenderweise in der Mitochondrienfraktion nachgewiesen werden, da die Aktivität der Carnitin-Acetyltransferase in dieser Fraktion erheblich zunahm (Abb. 9b). Die Aktivierung durch Digitonin konnte noch verstärkt werden, wenn kurzzeitig

tiefgefrorenen Gradientenfraktionen für den Enzymtest verwendet wurden.

Die erhaltenen Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß die Carnitin-Acetyltransferase in beiden Organellen lokalisiert ist. Die gesteigerte Aktivität der Carnitin-Acetyltransferase nach Inkubation mit Digitonin läßt außerdem vermuten, daß das mitochondriale Enzym membrangebunden vorliegt. Um weitere Anhaltspunkte darüber zu erhalten, ob tatsächlich eine duale Lokalisation dieses Enzyms anzunehmen ist, wurde die Transferase-Aktivität der Mitochondrien und Peroxisomen eingehender untersucht.

Tabelle 6: Charakterisierung der Carnitin-Acetyltransferasen

	<u>Mitochondrien</u> (Fraktion 11)	<u>Peroxisomen</u> (Fraktion 15)
pH-Optimum	7.6 - 7.8	7.6 - 7.8
Reaktion	reversibel	reversibel
Aktivierung durch Digitonin-Inkubation	etwa 3-fach	gering

Nach Lineweaver-Burk ermittelte Konstanten:

K_m (L-Acetyl-Carnitin)	300 μM	300 μM
K_m (CoA)	79 μM	39 μM

Substratspezifität:

Acetyl-CoA	100 %*	100 %*
Propionyl-CoA	179 %	102 %
Butyryl-CoA	8 %	5 %
Hexanoyl-CoA	0 %	0 %
Octanoyl-CoA	0 %	0 %
Decanoyl-CoA	0 %	0 %
Palmitoyl-CoA	0 %	0 %
Isobutyryl-CoA	4 %	3 %
β -Hydroxybutyryl-CoA	0 %	0 %
Acetoacetyl-CoA	0 %	0 %
Malonyl-CoA	3 %	3 %

(* = Die Umsatzrate mit Acetyl-CoA wurde als 100 % gesetzt)

Da eine Trennung der beiden Carnitin-Acetyltransferasen mittels Chromatographie an DEAE-Sephadex erfolglos blieb, wurde eine Charakterisierung der Enzyme aus den Mitochondrien- und Peroxisomenfraktionen eines Dichtegradienten vorgenommen. Wie aus den Verteilungsprofilen der Katalase- und der Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität in Abbildung 9b und c zu entnehmen ist, stand für diese Messungen jedoch keine völlig reine Peroxisomen- bzw. Mitochondrienfraktion zur Verfügung. Eine geringe Verfälschung der Ergebnisse durch Fremdaktivität muß daher berücksichtigt werden.

Die untersuchten Carnitin-Acetyltransferasen sind bezüglich ihrer Substrataffinität und des pH-Optimums den aus tierischen Zellen isolierten Enzymen ähnlich (MARKWELL et al. 1973). Die Substratspezifität der Transferasen ist jedoch im Vergleich zu tierischen Zellen bei Bumilleriopsis sehr viel stärker auf kurzkettige Moleküle ausgerichtet.

Ein Vergleich der mitochondrialen Transferase mit dem peroxisomalen Enzym (Tabelle 6) läßt bei Bumilleriopsis ebenfalls deutliche Unterschiede erkennen. Die Aktivität der mitochondrialen Carnitin-Acetyltransferase wird, wie bereits erwähnt, erheblich stärker durch eine Inkubation mit Digitonin beeinflusst als die des peroxisomalen Enzyms. Außerdem wird Propionyl-CoA in der Mitochondrien etwa mit der doppelten Geschwindigkeit umgesetzt wie Acetyl-CoA, was bei der peroxisomalen Transferase nicht der Fall ist. Diese Ergebnisse erhärten die Annahme, daß die Carnitin-Acetyltransferase sowohl in den Mitochondrien als auch in den Peroxisomen lokalisiert ist.

Eine Überprüfung der biochemischen Untersuchungen mit Hilfe eines cytochemischen Nachweises der Transferasen verlief negativ. Da diese Nachweismethode bisher jedoch ausschließlich bei tierischen Objekten angewendet wurde, ist vermutlich für pflanzliche Zellen eine Modifizierung des Verfahrens notwendig.

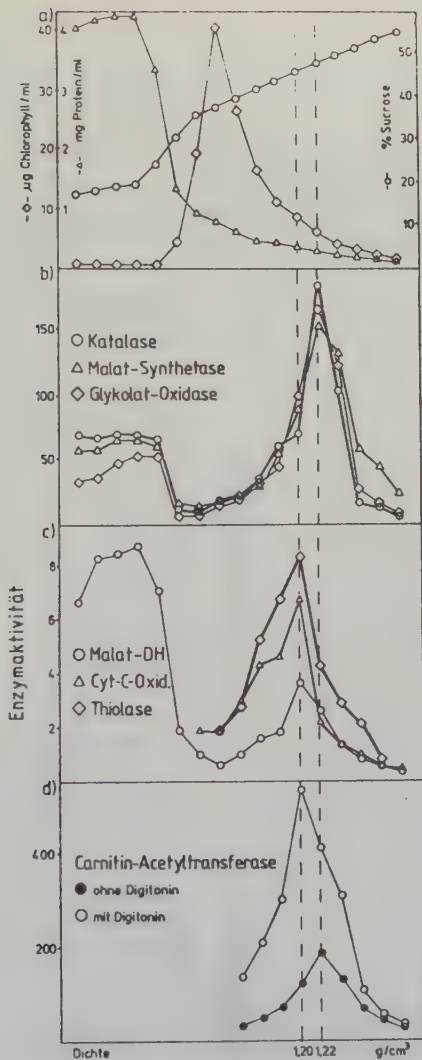


Abbildung 9: Verteilung peroxisomaler und mitochondrialer Enzyme von *Bumilleriopsis filiformis* im Saccharose-Dichtegradienten

Enzymeinheiten: Wert der Ordinate $\times$ Faktor = nmol/min $\times$ ml Fraktion
 (Katalase $\times 10^3$; Glykolat-Oxidase $\times 0.5$; Malatsynthetase $\times 0.2$;
 Cytochrom-C-Oxidase $\times 20$; Malat-Dehydrogenase $\times 100$; Thiolase $\times 0.25$;
 Carnitin-Acetyltransferase $\times 1$)

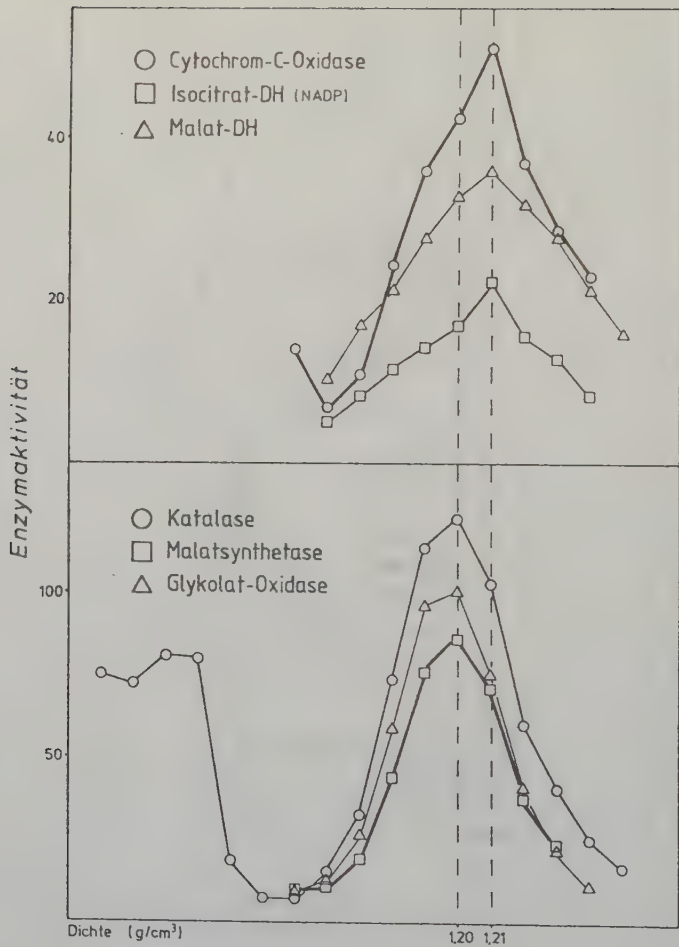


Abbildung 10: Verteilung von mitochondrialen und peroxisomalen Enzymen aus Bumilleriopsis nach Kurzzeit-Zentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten

Enzymeinheiten: Wert der Ordinate x Faktor = nmol/min x ml Fraktion
 (Katalase x 10^3 ; Glykolat-Oxidase x 0.5; Malatsynthetase x 0.17;
 Cytochrom-C-Oxidase x 1.2; Isocitrat-Dehydrogenase (NADP) x 1;
 Malat-Dehydrogenase x 10)

e) Verknüpfung von Glyoxylat-Produktion und Malat-Synthese

Den folgenden Untersuchungen lag die Überlegung zu Grunde, daß sich eine Änderung in der Glykolat-Produktion auf die spezifische Aktivität der Malatsynthetase auswirken könnte, wenn dieses Enzym am Glykolatstoffwechsel beteiligt ist.

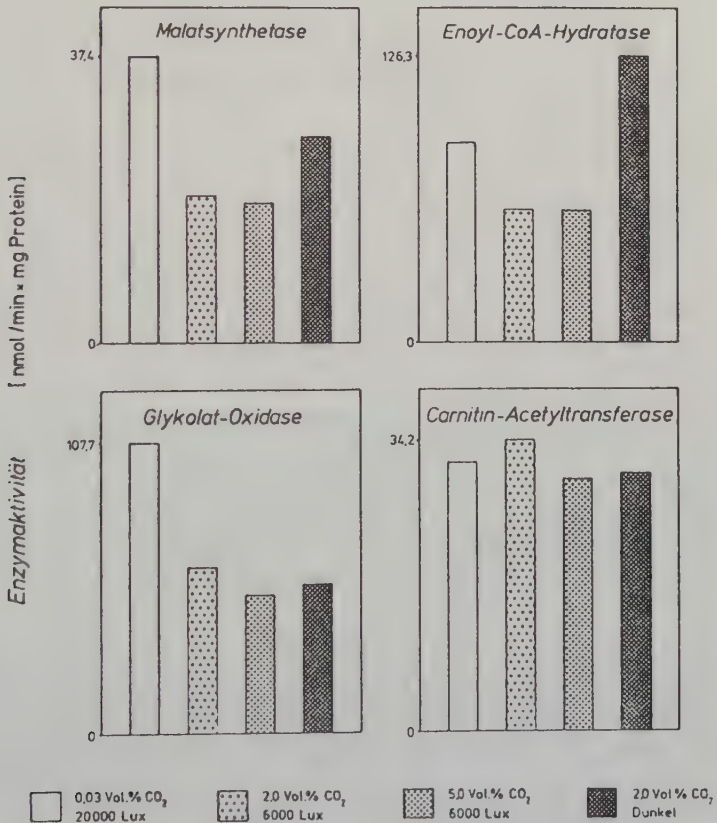


Abbildung 11: Einfluß unterschiedlicher Kulturbedingungen auf die Aktivität verschiedener Enzyme

(Die Messung der Enzymaktivität erfolgte jeweils nach vier Tagen Kulturdauer aus dem Zellextrakt. Die Aktivität der Carnitin-Acetyltransferase wurde nach einer Vorinkubation mit Digitonin bestimmt.)

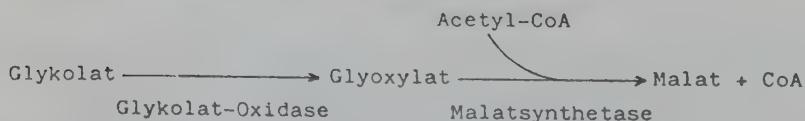
Wie aus Abbildung 11 zu entnehmen ist, wird die spezifische Aktivität der Glykolat-Oxidase und der Malatsynthetase unter Kulturbedingungen mit vermindertem CO_2 -Partialdruck sowie unter Starklicht gegenüber der Kultur mit 2% CO_2 und 6000 Lux erheblich gesteigert. Bemerkenswert ist dabei, daß die gemessenen Aktivitäten der beiden Enzyme in den drei im Licht angezogenen Kulturen ein erstaunlich konstantes Verhältnis aufweisen. Bei den im Dunkeln gehaltenen Algen wird dagegen das Verhältnis zu Gunsten der Malatsynthetase-Aktivität verschoben. Die spezifische Aktivität der Carnitin-Acetyltransferase wird durch wechselnde Kulturbedingungen nur unwesentlich beeinflusst.

Stellvertretend für die β -Oxidation wurde die Aktivität der Enoyl-CoA-Hydratase gemessen, die unter 0.03% CO_2 -/Starklicht-Bedingungen leicht und bei der Dunkelkultur stark zunimmt. Die gesteigerte Aktivität der β -Oxidation bei Kulturbedingungen mit hohem Licht- und niedrigem CO_2 -Angebot läßt sich sehr gut in die Hypothese einfügen, daß die Mitochondrien als Quelle für das zur Malat-Synthese notwendige Acetyl-CoA dienen.

Die Ergebnisse dieser Versuche führen zu der Annahme, daß durch eine gesteigerte Glykolat-Produktion das Substratangebot für die Malatsynthetase zunimmt.

Unklar bleibt, worauf die erhöhte Aktivität der Malatsynthetase bei der Dunkelkultur zurückzuführen ist.

Im folgenden Versuch wurde einer Peroxisomenfraktion Glykolat und Acetyl-CoA als Substrat angeboten, um zu überprüfen, ob gemäß der unten dargestellten Reaktionsfolge eine Abnahme von Acetyl-CoA photometrisch verfolgt werden kann.



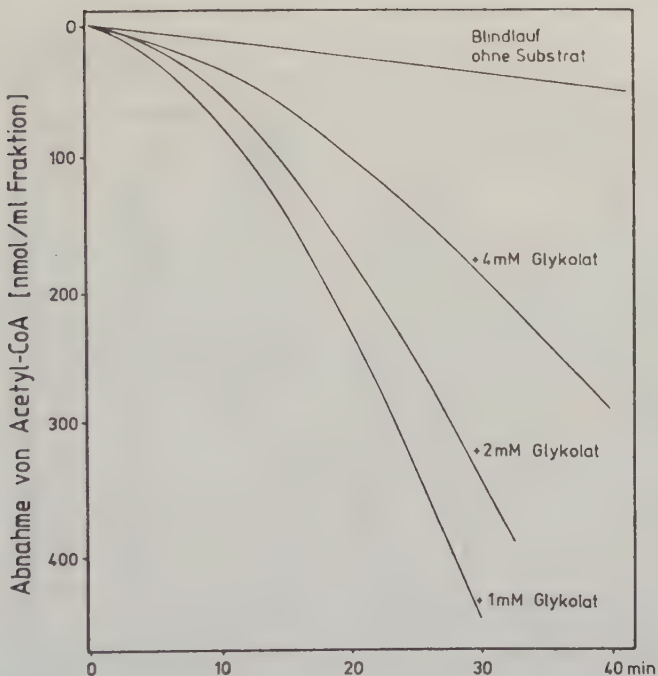


Abbildung 12: Enzymatischer Umsatz von Acetyl-CoA in einer Peroxisomenfraktion nach Zugabe verschiedener Glykolat-Konzentrationen

(Reaktionsansatz (1 ml): 50 mM Tricin-Puffer, pH 8,0, 0,5 mM $MgCl_2$, 0,15 mM Acetyl-CoA, 0,1 ml Peroxisomenfraktion, Glykolat in den angegebenen Konzentrationen. Die Abnahme von Acetyl-CoA wurde bei 232 nm verfolgt.)

Nach Zugabe von Glykolat zum Reaktionsansatz kann eine deutliche Abnahme der Acetyl-CoA-Konzentration beobachtet werden (Abbildung 12). Mit welcher Geschwindigkeit jedoch die maximale Umsatzrate erreicht wird, ist entscheidend von der zugefügten Glykolatmenge abhängig, da Glykolat die Affinität der Malatsynthetase zu Glyoxylat herabsetzt (Tabelle 5).

In einem Parallelversuch zur Bestimmung der Malat-Produktion wurden die organischen Säuren des Reaktionsansatzes nach einer Stunde Inkubationszeit säulenchromatographisch aufgetrennt (Abbildung 13).

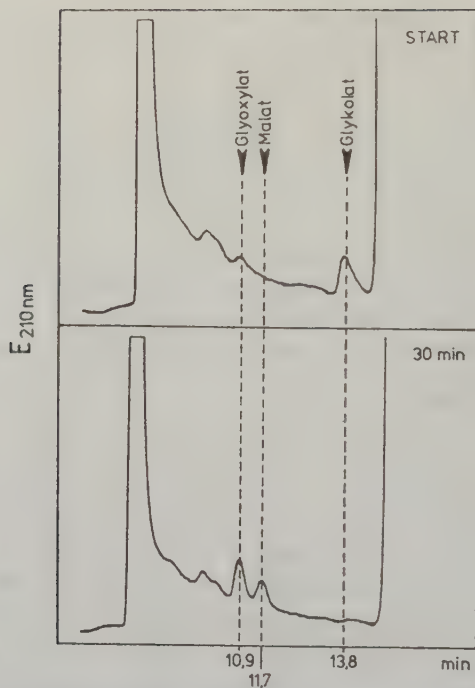


Abbildung 13: Enzymatischer Umsatz von Glykolat und Acetyl-CoA in einer Peroxisomenfraktion.

(Reaktionsansatz (1 ml): 50 mM Tricin-Puffer, pH 8.0, 0.5 mM MgCl_2 , 0.15 mM Acetyl-CoA, 0.5 ml Peroxisomenfraktion, 0.5 mM Glykolat. Unmittelbar nach Zugabe von Glykolat sowie nach 30 Minuten wurden Proben entnommen und analysiert.

Auftrennung der organischen Säuren mittels HPLC;

Laufmittel: 2.6 mM H_2SO_4 ; Fluß: 0.6 ml/min; Temperatur: 10°C)

Die Ergebnisse der säulenchromatographischen Trennung bestätigten die Annahme, daß in Anwesenheit von Glykolat und Acetyl-CoA in der Peroxisomenfraktion Malat produziert wird. Um die Bedeutung dieser Stoffwechselsequenz beurteilen zu können, wurden analoge Versuche mit ^{14}C -markiertem Glykolat durchgeführt.

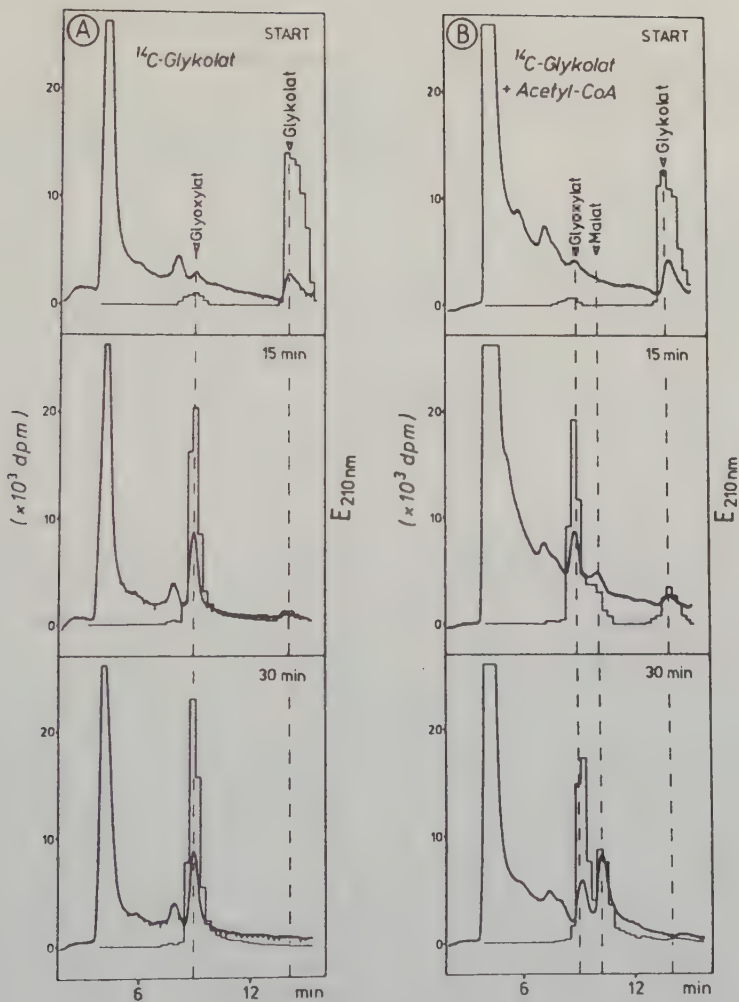


Abbildung 14: Enzymatischer Umsatz von ^{14}C -Glykolat in einer Peroxisomenfraktion

Durchgezogene Linie: Absorption, gestufte Linie: Radioaktivität
(Auftrennung der organischen Säuren mittels HPLC;

Laufmittel: 2.6 mM H_2SO_4 , Fluß: 0.6 ml/min, Temperatur: 10°C)

Tabelle 7: Verteilung der Radioaktivität auf die verschiedenen Reaktionsprodukte der Versuche A und B

	Versuch A		Versuch B	
	(+Glykolat)		(+Glykolat, +Acetyl-CoA)	
Freigesetztes CO ₂	15.7	0.5%	41.6	1.1%
Aminosäuren/Zucker	23.0	0.7%	30.3	0.8%
Phosphatester/Oxalat/ (Oxalacetat)	316.2	9.1%	384.1	10.2%
Glyoxylat	3105.0	90.0%	2133.0	56.8%
Malat	0.0	0.0%	1165.1	31.0%

(Radioaktivität in dpm x 10³)

Ein Vergleich der Ergebnisse von Versuch A und B verdeutlicht, daß für den peroxisomalen Umsatz von Glykolat zu Malat die Anwesenheit von Acetyl-CoA notwendig ist (Abb. 14). Außerdem kann in Versuch B eine Akkumulation von Malat verfolgt werden, die jedoch erst verstärkt einsetzt, nachdem das Glykolat weitestgehend zu Glyoxylat oxidiert worden ist. Ein Vergleich der Radioaktivitätsmengen in den verschiedenen Reaktionsprodukten (Tabelle 7) läßt erkennen, daß die Anwesenheit von Acetyl-CoA ausschließlich einen Einfluß auf die Malatproduktion ausübt. Darüber hinaus scheint unter den gewählten Versuchsbedingungen der Metabolismus von Glykolat zu CO₂, Aminosäuren oder Phosphatestern (einschließlich Oxalacetat und Oxalat) nur eine unbedeutende Rolle zu spielen. Die erhöhte Radioaktivität in der Phosphatester-Fraktion und dem CO₂ bei Versuch B könnte darauf hinweisen, daß Malat in geringen Mengen unter CO₂-Abspaltung metabolisiert wurde. Da die Produktion von Malat in Versuch B nach 30 Minuten über 30% des Gesamtumsatzes ausmacht, könnte diesem Reaktionsweg eine vorherrschende Bedeutung im Glykolatstoffwechsel von Bumilleriopsis zukommen.

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erläutert, besteht die Möglichkeit, daß das Acetyl-CoA für die Malat-Synthese mit Hilfe der Carnitin-Acetyltransferase in die Peroxisomen transportiert wird. Aus dieser Überlegung heraus, wurde der Glykolat-Umsatz einer Peroxisomenfraktion in Anwesenheit von Acetylcarnitin und Coenzym A untersucht.

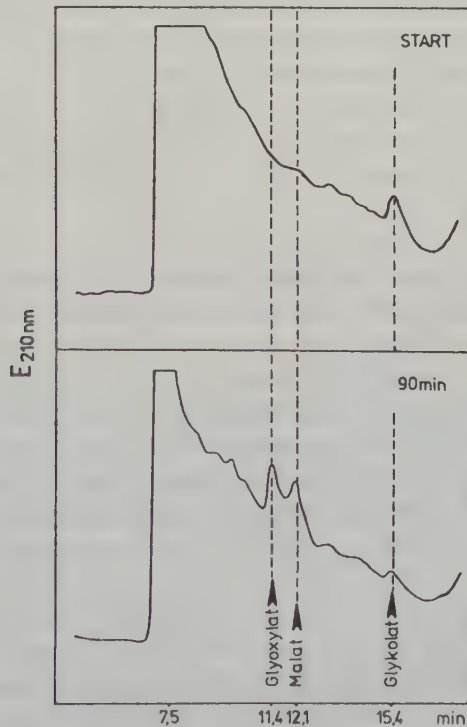


Abbildung 15: Enzymatischer Umsatz von Glykolat und Acetylcarnitin in einer Peroxisomenfraktion

(Reaktionsansatz (1 ml): 0.6 ml Peroxisomenfraktion, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM Na-EDTA, 1 mM Co-Enzym A, 1 mM MgCl_2 , 5 mM Acetyl-DL-carnitin, 0.5 mM Na-Glykolat. Unmittelbar nach Zugabe von Glykolat sowie nach 90 min wurden Proben entnommen und analysiert. Auftrennung der organischen Säuren mittels HPLC, Laufmittel: 2.6 mM H_2SO_4 , Fluß: 0.55 ml/min, Temperatur: 10°C)

Aus den Ergebnissen der chromatographische Auftrennung der Reaktionsprodukte in Abbildung 15 geht deutlich hervor, daß in den Peroxisomen auch dann ein Umsatz von Glykolat zu Malat erfolgt, wenn Acetyl-CoA durch Acetylcarnitin und Coenzym A ersetzt wird.

Die bisher erhaltenen Ergebnisse belegen, daß in den Peroxisomen Glykolat zu Malat umgesetzt werden kann. Es ist jedoch nicht anzunehmen, daß Malat das Endprodukt des Glykolatstoffwechsels bildet. Für den weiteren Umsatz der Äpfelsäure kommt in erster Linie die Oxidation zu Oxalessigsäure in Betracht, die durch die Malat-Dehydrogenase katalysiert wird.

Durch den geringen Dichteunterschied der Peroxisomen und Mitochondrien im Saccharose-Dichtegradienten ist eine Differenzierung zwischen peroxisomaler und mitochondrialer Malat-Dehydrogenase sehr problematisch. Auch eine Trennung dieser Organellen mit Hilfe eines PERCOLL-Gradienten ergab keine verbesserte Auflösung der Aktivitätsverteilung der Malat-Dehydrogenase. Aus diesem Grund ist keine eindeutige Aussage über das Vorkommen einer peroxisomalen Malat-Dehydrogenase möglich, so daß für den weiteren Umsatz von Malat vor allem der Tricarbonsäurezyklus und die Gluconeogenese angenommen wird.

Um weitere Hinweise auf den Metabolismus von Malat zu erhalten, wurde eine Mischfraktion, die sowohl Peroxisomen als auch Mitochondrien enthielt, in Anwesenheit von Malat, Acetyl-CoA und Deamino-NAD inkubiert und die organischen Säuren des Reaktionsansatzes säulenchromatographisch aufgetrennt.

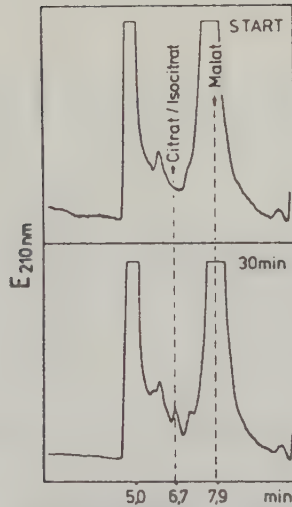


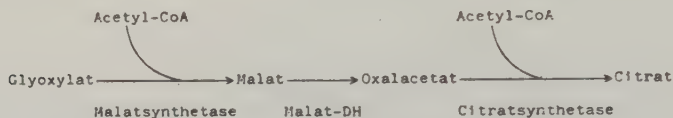
Abbildung 16: Enzymatischer Umsatz von Malat und Acetyl-CoA in einer Mischfraktion aus Peroxisomen und Mitochondrien

(Reaktionsansatz (1 ml): 0.7 ml Partikelfraktion, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $MnCl_2$, 0.4 mM Deamino-NAD, 0.15 mM Acetyl-CoA, 6 mM Na-Malat. Unmittelbar nach Zugabe von Malat sowie nach 30 Minuten wurden Proben entnommen und analysiert. Auftrennung der organischen Säuren mittels HPLC, Laufmittel: 30 mM H_2SO_4 , Fluß: 0.8 ml/min, Temperatur: 65°C).

Die in Abbildung 16 dargestellten Ergebnisse machen deutlich, daß nach einer Stunde Inkubationszeit ein geringer Teil des Malats (59 pmole/min x ml Fraktion) zu Citrat bzw. Isocitrat umgesetzt wurde. –(Eine ausreichende Trennung von Citrat und Isocitrat konnte mit der verwendeten Methode nicht erreicht werden.)

In einem Parallelversuch, der statt Malat Glyoxylat (10 mM) enthielt, konnte dagegen keine Bildung von Reaktionsprodukten

festgestellt werden. Vermutlich ist durch die Einbeziehung eines weiteren Reaktionsschrittes (s.unten) die Konzentration der Reaktionsprodukte noch geringer als im vorangegangenen Versuch, so daß die gebildeten Substanzen mit der verwendeten Methode nicht mehr nachzuweisen sind.



f) Untersuchungen zum Fettsäuretransport durch die Mitochondrienmembran

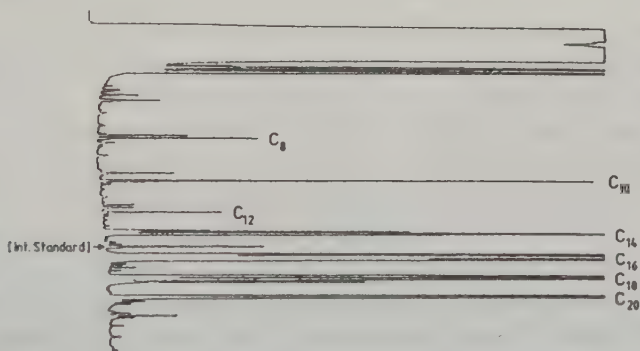
Da die β -Oxidation bei der Alge *Bumilleriopsis* ausschließlich in den Mitochondrien abläuft, stellt sich die Frage, auf welche Weise die Fettsäuren in diese Organellen gelangen.

In tierischen Zellen wird für den Transport langkettiger Fettsäuren durch die Mitochondrienmembran ein aktiver Mechanismus mit Hilfe einer Carnitin-Palmitoyltransferase angenommen (HALPERIN & PANDE 1979).

Bei der Charakterisierung der Carnitin-Acetyltransferasen aus *Bumilleriopsis* konnte jedoch, wie aus Tabelle 6 zu entnehmen ist, ein Umsatz von langkettigen CoA-Estern nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse könnten allerdings auf suboptimale Versuchsbedingungen zurückzuführen sein. Aus diesem Grund wurde das Detergenz Digitonin im Testansatz durch Triton X-100 (Endkonzentration: 0.01%) ersetzt und die Inkubationszeit variiert. Da Befunde an tierischen Zellen auf eine Substrathemmung der Carnitin-Palmitoyltransferase durch CoA-Ester hinweisen (BREMER 1977), erfolgte außerdem eine Meßreihe mit stufenweiser Verringerung der Palmitoyl-CoA-Konzentration im Testansatz. Der Nachweis einer Carnitin-Palmitoyltransferase konnte jedoch auch unter den veränderten Versuchsbedingungen nicht geführt werden.

Eine zweite Möglichkeit des Fettsäuretransports besteht in der Diffusion der freien Fettsäuren durch die Mitochondrienmembran. Nach Meinung vieler Autoren bleibt dieser passive Transport allerdings auf kurzkettige Moleküle beschränkt, da die Durchdringungsgeschwindigkeit mit zunehmender Kettenlänge erheblich abnimmt. Außerdem ist bei einem Transport durch Diffusion eine innermitochondriale Fettsäureaktivierung zu fordern, die jedoch ebenfalls nur für kurz- und mittelkettige Moleküle nachgewiesen wurde (GROOT 1975 und 1976).

Aus diesen Überlegungen heraus erfolgte eine Analyse der Fettsäurezusammensetzung von Bumilleriopsis, um Aufschluß über den Anteil kurz- und mittelkettiger Fettsäuren zu erhalten.



Kettenlänge	mg Fettsäure/ g Trockengewicht
8:0	1.0 (0.6%)
10:0	2.2 (1.4%)
12:0	1.4 (0.9%)
14:0	14.2 (8.9%)
16:3	7.3 (4.5%)
16:2	54.1 (33.7%)
16:0	24.4 (15.2%)
18:1	22.1 (13.8%)
18:0	10.6 (6.6%)
20:(5)	22.1 (13.8%)
20:(4)	1.2 (0.8%)

Gesamtfettgehalt: 160.1 mg/g Trockengewicht

Abbildung 17: Fettsäurezusammensetzung von Bumilleriopsis

Die Ergebnisse der Fettsäure-Analyse verdeutlichen, daß sich bei Bumilleriopsis über 50% der Fettsäuren aus 16 C-Atomen zusammensetzen, der Anteil der Kurz- und mittelkettigen Fettsäuren dagegen nur etwa 10% beträgt. Die Befunde geben jedoch nur bedingt Aufschluß darüber, welche Kettenlänge in der mitochondrialen β -Oxidation bevorzugt umgesetzt wird. Eine geeignete Methode dieses Problem weiter einzugrenzen, bot sich in der Charakterisierung der Acyl-CoA-Dehydrogenase, dem Eingangsenzym der β -Oxidation.

Tabelle 8: Substratspezifität der Acyl-CoA-Dehydrogenase

Substrat	Aktivität (nmol/min x ml Fraktion)
Hexanoyl-CoA (C ₆)	7.8
Decanoyl-CoA (C ₁₀)	16.7
Lauroyl-CoA (C ₁₂)	6.5
Palmitoyl-CoA (C ₁₆)	11.1
Stearoyl-CoA (C ₁₈)	9.9

Wie die Ergebnisse aus Tabelle 8 zeigen, katalysiert die Acyl-CoA-Dehydrogenase bevorzugt den Umsatz von Fettsäuren der Kettenlänge C₁₀ und C₁₆. Dies legt die Vermutung nahe, daß die Mitochondrien von Bumilleriopsis - ebenso wie die tierischer Zellen - mindestens zwei Acyl-CoA-Dehydrogenasen besitzen, die auf den Umsatz von Fettsäuren verschiedener Kettenlängen spezialisiert sind.

Anhand der oben beschriebenen Befunde ist es nicht möglich, bei der Alge Bumilleriopsis eine eindeutige Aussage zu Gunsten eines aktiven oder eines passiven Fettsäuretransports durch die Mitochondrienmembran zu machen.

4. Die peroxisomale und mitochondriale Enzymausstattung von *Vaucheria*

Befunde über eine Trennung von Peroxisomen und Mitochondrien aus einem Homogenat von Salzwasseralgen durch isopyknische Dichtegradientenzentrifugation sind aus der Literatur nicht bekannt.

Es galt daher zunächst, für den marinen Organismus *Vaucheria* ein geeignetes Verfahren zur Isolierung von Zellorganellen zu entwickeln.

Bei diesen Versuchen wurde die Eignung verschiedener Osmotika und Zellaufschlußverfahren geprüft. Mit Hilfe der erhaltenen Ergebnisse konnte die Trennung von Zellorganellen aus einem Homogenat von *Vaucheria* erheblich verbessert werden. Da der Protoplast bei der Schlauchalge oft nur einen dünnen Wandbelag bildet (Tafel 3c), ist es notwendig, eine wesentlich größere Materialmenge aufzuschließen als bei *Bumilleriopsis*, um vergleichbar hohe Enzymaktivität im Dichtegradienten zu erhalten. Bei der Verwendung großer Algenmengen konnte jedoch eine Inaktivierung der Enzyme, vermutlich durch Inhaltsstoffe, festgestellt werden.

Die Darstellung in Abbildung 18 läßt eine relativ breite Verteilung der Katalase-Aktivität im Saccharosegradienten mit einem Maximum bei einer spezifischen Dichte von 1.23 erkennen. (Dieser Effekt konnte in allen Parallelversuchen beobachtet werden und deutet daraufhin, daß das Trennverfahren für die isolierte *Vaucheria*-Art noch nicht optimal ist).

Die höchste partikelgebundene Aktivität der Glykolat-Oxidase und der Malatsynthetase konnte bei *Vaucheria* in der Peroxisomenfraktion gemessen werden.

Das mitochondriale Leitenzym Cytochrom-C-Oxidase weist, wie in Abb. 18 dargestellt, ein deutliches Aktivitätsmaximum bei einer Dichte von $1,20 \text{ g/cm}^3$ auf.

Die Enoyl-CoA-Hydratase, ein Enzym der β -Oxidation, konnte ebenfalls in der Mitochondrienfraktion lokalisiert werden.

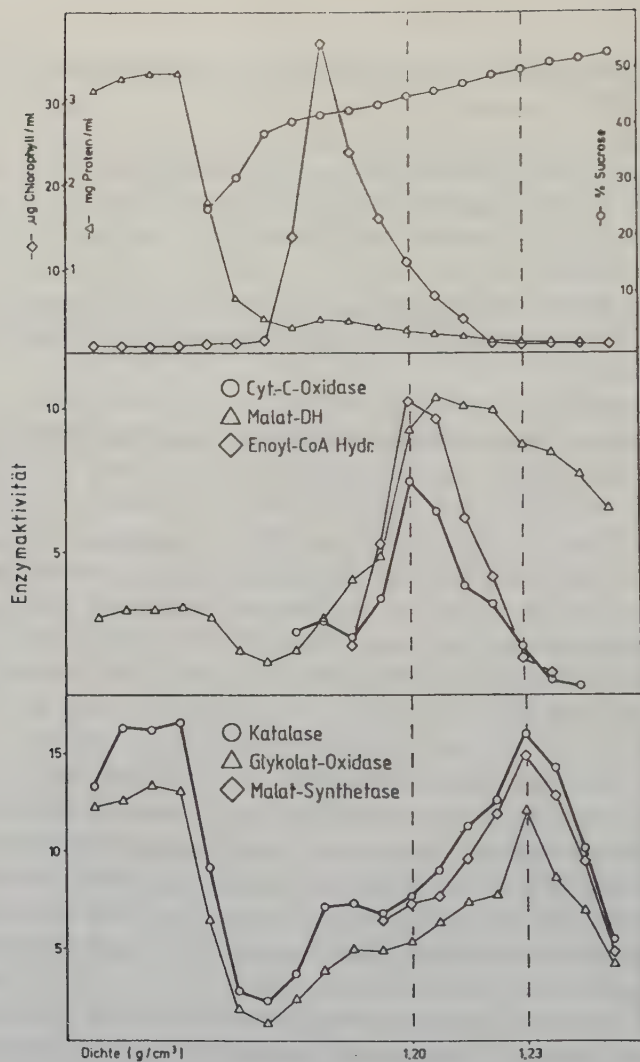


Abbildung 17: Verteilung peroxisomaler und mitochondrialer Enzyme aus *Vaucheria spec.* im Saccharose-Dichtegradienten

Enzymeinheiten: Wert der Ordinate x Faktor = nmol/min x ml Fraktion
 (Katalase x 10³; Glykolat-Oxidase x 0.6; Malatsynthetase x 0.35;
 Cytochrom-C-Oxidase x 1; Malat-Dehydrogenase x 12; Enoyl-CoA-Hydratase x 3)

Auffallend ist das Verteilungsprofil der Malat-Dehydrogenase, das ein sehr breit gestreutes Maximum bei einer spezifischen Dichte von 1.21 aufweist. Diese Beobachtung konnte bei mehreren Parallelversuchen gemacht werden und deutet möglicherweise auf das Vorkommen einer peroxisomalen Malat-Dehydrogenase hin.

Aus den vorliegenden Ergebnissen ergeben sich keine wesentlichen Unterschiede in Bezug auf die peroxisomale und mitochondriale Enzymausstattung der coccalen Süßwasser-Alge *Bumilleriopsis* und der siphonalen Salzwasser-Alge *Vaucheria*.

5. Versuche zur Zellorganelltrennung an *Heterococcus*, *Tribonema* und *Botrydium*

Die Mitochondrien und Peroxisomen der Xanthophyceen *Botrydium*, *Tribonema* und *Heterococcus* konnten nach dem beschriebenen Standardverfahren mit Hilfe eines linearen Saccharose-Dichtegradienten nicht ausreichend voneinander getrennt werden. Aus diesem Grund wurde die verwendete Methode in folgender Weise verändert:

1. Austausch des Tricin-Puffers durch Kaliumphosphat, Tris-HCl und Glycylglycin.
2. Änderung des pH-Wertes von 8.0 auf 7.0, 7.5 und 8.5.
3. Verringerung der Pufferkonzentration von 50 mM auf 25 mM.
4. Änderung der Konzentration der einzelnen Schutzreagenzien.
5. Variation der Zusammensetzung der Schutzreagenzien
6. Änderung der Zentrifugationsdauer.
7. Verringerung der verwendeten Algenmenge.
8. Änderung der Gradientenanstiegs (30 bis 52% Saccharose).
9. Variation der Zellaufschlußmethode.

Trotz der z. T. hohen Ausbeute an partikelgebundener Enzymaktivität führten diese Modifikationen des Verfahrens bei

keiner der drei Arten zu einer erkennbaren Verbesserung der Organelltrennung.

Die Ursache für die unzureichende Trennung von Mitochondrien und Peroxisomen ist vermutlich auf eine Art Agglutination der Organellen während des Trennverfahrens (oder auf eine ungewöhnlich geringe spezifische Dichte der Peroxisomen dieser Algen) zurückzuführen.

Ein sogenannter "trapping effect", d.h. ein Zurückhalten von Organellen hoher spezifischer Dichte in einer Bande von Partikeln, die bereits ihr Sedimentationsgleichgewicht bei einer geringeren Dichte erreicht haben (FEIERABEND & BEEVERS 1972), ist bei den untersuchten Algen wahrscheinlich auszuschließen, da auch die Verwendung eines stark verdünnten Homogenates zu dem gleichen Ergebnis führte.

Die erhaltenen Ergebnisse über die Verteilung peroxisomaler und mitochondrialer Enzyme im Dichtegradienten unterscheiden sich bei den drei Xanthophyceen nur unwesentlich. Aus diesem Grund sind in Abbildung 19 lediglich die für Botrydium erhaltenen Befunde wiedergegeben.

Aus den Verteilungsprofilen der Cytochrom-C-Oxidase- und der Katalase-Aktivität ist zu entnehmen, daß die Mitochondrien und Peroxisomen von Botrydium ihre Gleichgewichtslage im Saccharosegradienten etwa bei der gleichen spezifischen Dichte erreichen (1.20 bzw. 1.21).

Wie die Verteilung des Chlorophyllgehaltes zeigt, wurden die Chloroplastenfragmente dagegen deutlich von diesen Organellen getrennt.

Die Aktivitätsverteilung der Glykolat-Oxidase und der Uricase ist weitgehend mit dem Profil der Katalase-Aktivität identisch, so daß eine peroxisomale Lokalisation dieser beiden Enzyme angenommen werden kann.

Das Vorkommen einer Hydroxypyruvat-Reduktase in den Peroxisomen oder Mitochondrien kann auch bei diesen drei Xanthophyceen ausgeschlossen werden, da eine NAD-abhängige Reduktion von Hydroxypyruvat nur in den Überstandfraktionen des Gradienten nachgewiesen werden konnte.

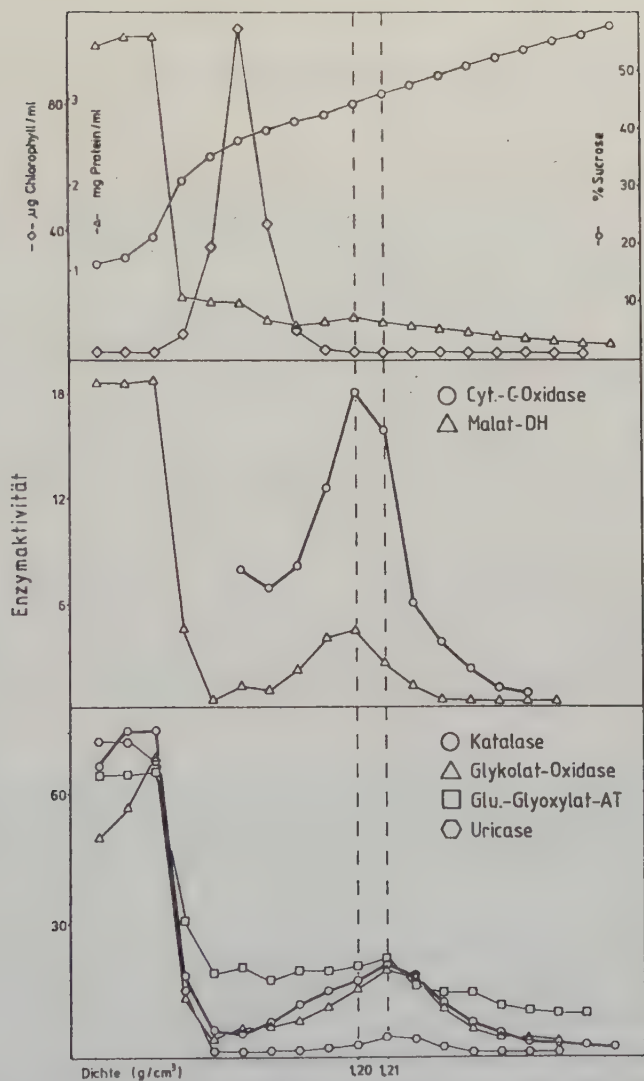


Abbildung 19: Verteilung von Enzymen aus *Botrydium granulatum* im Saccharose-Dichtegradienten

Enzymeinheiten: Wert der Ordinate $\times$ Faktor = nmol/min $\times$ ml Fraktion (Katalase $\times 10^3$; Glykolat-Oxidase $\times 0.75$; Uricase $\times 0.075$; Glutamat-Glyoxylat-Aminotransferase $\times 2.2$; Cytochrom-C-Oxidase $\times 1$; Malat-Dehydrogenase $\times 110$)

6. Vergleichende enzymatische Untersuchungen an verschiedenen Xanthophyceen

Aus den zuvor genannten Gründen wurden nur bei zwei der untersuchten Xanthophyceen Ergebnisse erhalten, die eine eindeutige Aussage über die intrazelluläre Lokalisation verschiedener Enzyme ermöglichen.

Ein Vergleich der Enzymausstattung aller fünf Xanthophyceen-Arten mußte sich daher auf Enzymnachweise aus dem Zellextrakt beschränken.

Das Vorkommen einer Isocitrat-Lyase konnte, nach Dialyse des Zellextraktes, bei keiner der untersuchten Algen festgestellt werden (Tabelle 9).

Die spezifische Aktivität der Katalase, Glykolat-Oxidase und Malatsynthetase variiert bei den verschiedenen Arten nur geringfügig. Eine Sonderstellung nehmen die beiden siphonalen Xanthophyceen nehmen insofern ein, als bei ihnen die spezifische Aktivität der Carnitin-Acetyltransferase erheblich geringer ist.

Analog zu den Versuchen an *Bumilleriopsis* wurde auch bei den anderen Xanthophyceen die Glykolat-Oxidase sowie das hydroxypyruvat-reduzierende Enzym genauer charakterisiert.

Die Charakterisierung der Glykolat-Oxidase erfolgte jeweils nach Anreicherung des Enzyms durch eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung.

Die Ergebnisse in Tabelle 10 lassen eine erstaunliche Übereinstimmung in den katalytischen Eigenschaften der einzelnen Glykolat-Oxidasen erkennen. (Lediglich die aus *Tribonema* isolierte Oxidase weist eine etwas geringere Affinität zu Glykolat auf).

Tabelle 9: Vorkommen verschiedener Enzyme im Zellextrakt einiger Xanthophyceen

	BUMILLERIOPSIS	HETEROCOCCUS	TRIBONEHA	BOTRYDIUM	VAUCHERIA
Katalase	102.0×10^3	87.5×10^3	84.6×10^3	125.3×10^3	75.9×10^3
Glykolat-Oxidase	56.0	46.6	62.8	28.9	36.7
NAD-abhängige Reduktion von Hydroxypyruvat	0.2	9.1	3.4	5.3	1.0
Malatsynthetase	18.6	13.5	15.0	10.8	7.9
Isocitrat-Lyase*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Carnitin-Acetyltransferase	30.6	29.1	28.0	1.5	1.3
Uricase	2.6	2.2	7.1	2.2	0.5

(* = Bei Verwendung eines dialysierten Zellextraktes (s. Kapitel 3c))

Alle Angaben in nmol/min x mg Protein

Tabelle 10: Charakterisierung der Glykolat-Oxidase aus verschiedenen Xanthophyceen
(Das Enzym wurde jeweils durch eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung (50 - 55% Sättigung) angereichert)

Substrat (5 mM)	Produkt bzw. O ₂ -Verbrauch	BUMILLERIOPSIS	HETEROCOCCUS	TRIBONEMA	BOTRYDIUM	VAUCHERIA
D-Lactat	Pyruvat	0,0 0,0%	1,0 0,6%	0,0 0,0%	1,0 0,8%	0,5 0,5%
L-Lactat	Pyruvat	6,3 4,6%	9,6 5,5%	11,5 4,1%	10,6 8,0%	3,9 4,0%
Glykolat	Glyoxylat	138,2 100,0%	176,3 100,0%	282,1 100,0%	129,6 100,0%	99,0 100,0%
Glykolat	H ₂ O ₂	129,5	215,5	274,8	201,1	82,1
Glykolat	O ₂ -Verbrauch	106,5	212,5	229,0	88,2	59,2
Glykolat + 2mM KCN	Glyoxylat	139,0 100,0%	185,0 100,0%	239,1 92,0%	108,7 84,0%	78,3 79,2%
Glyoxylat	Oxalat	42,7 33,0%	56,9 26,4%	41,2 15,0%	24,8 12,3%	11,2 13,7%

Nach Lineaveer-Burk ermittelte Konstanten:

K _m für Glykolat	250 µM	235 µM	500 µM	240 µM	250 µM
K _m für Glyoxylat	7140 µM	-	-	-	-
K _i für Oxalat (Substrat: Glykolat)	670 µM	-	-	-	-

(Enzymaktivitäten in nmol/min x mg Protein)

Tabelle 11: Charakterisierung des hydroxypyruvat-reduzierenden Enzyms aus dem partikelfreien Zellextrakt verschiedener Xanthophyceen

Substrat	Co-Substrat	Produkt	BUMILLERIOPSIS	HETEROCOCCUS	TRIBONEMA	BOTRYDIUM	VAUCHERIA					
Glyoxylat	NADH	Glykolat	17.1	10.2%	64.9	5.6%	18.1	4.8%	37.9	11.8%	9.8	22.5%
	NADPH		167.8	100.0%	415.8	100.0%	377.1	100.0%	321.5	100.0%	43.5	100.0%
Hydroxy- pyruvat	NADH	Glycerat	0.2	0.1%	9.1	2.2%	3.4	0.9%	5.3	1.6%	1.0	2.3%
	NADPH		14.4	8.6%	20.8	5.0%	38.1	10.1%	9.7	3.0%	3.7	8.5%
Pyruvat	NADH	Lactat	0.6	0.4%	10.8	2.6%	0.0	0.0%	0.0	0.0%	1.9	14.3%
	NADPH		0.0	0.0%	0.0	0.0%	0.0	0.0%	0.0	0.0%	0.0	0.0%

(Enzymaktivitäten in nmol/min x mg Protein)

Um zu prüfen, ob eine Hydroxypyruvat-Reduktase bei den einzelnen Xanthophyceen vorkommt, wurde der Umsatz verschiedener Substrat- und Co-Substrat-Kombinationen im partikel-freien Zellextrakt getestet (Tabelle 11).

Ein Vergleich der gemessenen Enzymaktivitäten führt zu dem Schluß, daß - ebenso wie bei Bumilleriopsis - auch bei den anderen gelb-grünen Algen ein Fehlen der Hydroxypyruvat-Reduktase angenommen werden kann.

IV. DISKUSSION

Auf elektronenmikroskopischen Bildern aller fünf untersuchten Xanthophyceen wurden Strukturen beobachtet, die den von FALK & KLEINIG (1968) beschriebenen Cytosomen aus *Tribonema* gleichen und die aufgrund charakteristischer morphologischer Merkmale - einfache begrenzende Membran, feingranuläre homogene Matrix relativ hoher elektronenoptischer Dichte - als Microbodies zu erkennen sind. Die im Anschnitt meist länglich-oval erscheinenden, 0.3 bis 0.6 μm großen Organellen treten häufig in Assoziation mit Mitochondrien und Chloroplasten auf. Bei *Heterococcus* und *Tribonema* ist die topographische Nähe insbesondere zu den Mitochondrien ausgeprägt, wogegen bei *Vaucheria* oft eine enge räumliche Beziehung der Microbodies zu den Chloroplasten auffällt.

Aus *Vaucheria* und *Bumilleriopsis* konnten die Microbodies isoliert werden. Zur biochemischen Charakterisierung der Organellen liegen insbesondere für die letztere Alge zahlreiche Befunde vor.

Durch das Vorkommen von Katalase und Uricase (als ein H_2O_2 -bildendes Enzym) in den Microbodies von *Bumilleriopsis* sind diese der Definition nach Peroxisomen. Da sie darüber hinaus auch Glykolat-Oxidase (Glykolat: O_2 -Oxidoreduktase) besitzen, sollte den Organellen aus *Bumilleriopsis* entsprechend den Peroxisomen grüner Blattgewebe eine wichtige Funktion im Rahmen des Stoffwechsels von Glykolsäure zukommen. Die Ähnlichkeit mit Blatt-Peroxisomen zeigt sich auch in dem Nachweis von Glutamat-Glyoxylat-Aminotransferase als Bestandteil der Peroxisomen. Unerwarteterweise sind jedoch weitere blatt-peroxisomale Enzyme des Glykolatstoffwechsels in den Peroxisomen von *Bumilleriopsis* nicht vorhanden. Hydroxypyruvat-Reduktase, ein Leitenzym der Blatt-Peroxisomen, fehlt bei *Bumilleriopsis* völlig sowie auch die Enzyme, die für den Umsatz von Glycin zu Hydroxypyruvat verantwortlich sind.

Im Vergleich zu höheren Pflanzen scheint damit der Glykolatstoffwechsel von *Bumilleriopsis* unvollständig zu sein. Die Ausscheidung von Glykolsäure und Glyoxylsäure konnte nicht nachgewiesen werden. Dies legt den Schluß nahe, daß auch bei *Bumilleriopsis* ein Stoffwechsel von Glykolsäure möglich ist, der jedoch von dem der höheren Pflanzen abweicht.

Grundsätzlich mußte in Betracht gezogen werden, daß bereits Glyoxylsäure teilweise anders als in Blatt-Peroxisomen umgesetzt werden könnte. Eine Möglichkeit hierzu besteht in der Oxidation dieser Säure zu Oxalat mittels Glykolat-Oxidase. Jedoch dürfte dieser Reaktionsschritt in *Bumilleriopsis* nur von untergeordneter Bedeutung sein, da die Glykolat-Oxidase nur eine äußerst geringe Affinität gegenüber Glyoxylat besitzt (K_m -Wert: 7.2 mM).

Weitaus gewichtiger ist dagegen die ungewöhnliche Beobachtung, daß in den Peroxisomen von *Bumilleriopsis* Malat-synthetase vorkommt. Die Entstehung von Malat aus Glyoxylsäure ließ sich durch den direkten Nachweis von Äpfelsäure mit Hilfe der HPLC belegen, sobald einer Peroxisomenfraktion von *Bumilleriopsis* Acetyl-CoA und Glyoxylat oder Glykolat zugesetzt wurde. Unklar ist jedoch der Verbleib von Malat, da ein weiterer Umsatz über den Glyoxylat-Zyklus wegen des Fehlens von Isocitrat-Lyase nicht in Betracht kommt. Auch Enzyme der β -Oxidation konnten in den Peroxisomen von *Bumilleriopsis* nicht nachgewiesen werden, so daß sich die Frage stellt, woher das für die Malat-Synthese notwendige Acetyl-CoA stammt.

Der Fettsäureabbau ist, neben der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat, der wichtigste Bildungsprozeß für Acetyl-CoA. Da die β -Oxidation bei *Bumilleriopsis* ausschließlich in den Mitochondrien abläuft, kommt hauptsächlich dieses Organell als Lieferant für Acetyl-CoA in Betracht. Durch den Nachweis einer relativ hohen Aktivität von Carnitin-Acetyltransferase in den Mitochondrien und den Peroxisomen von *Bumilleriopsis* wird die Annahme gestützt, daß ein Austausch von Acetyl-CoA zwischen diesen beiden Organellen

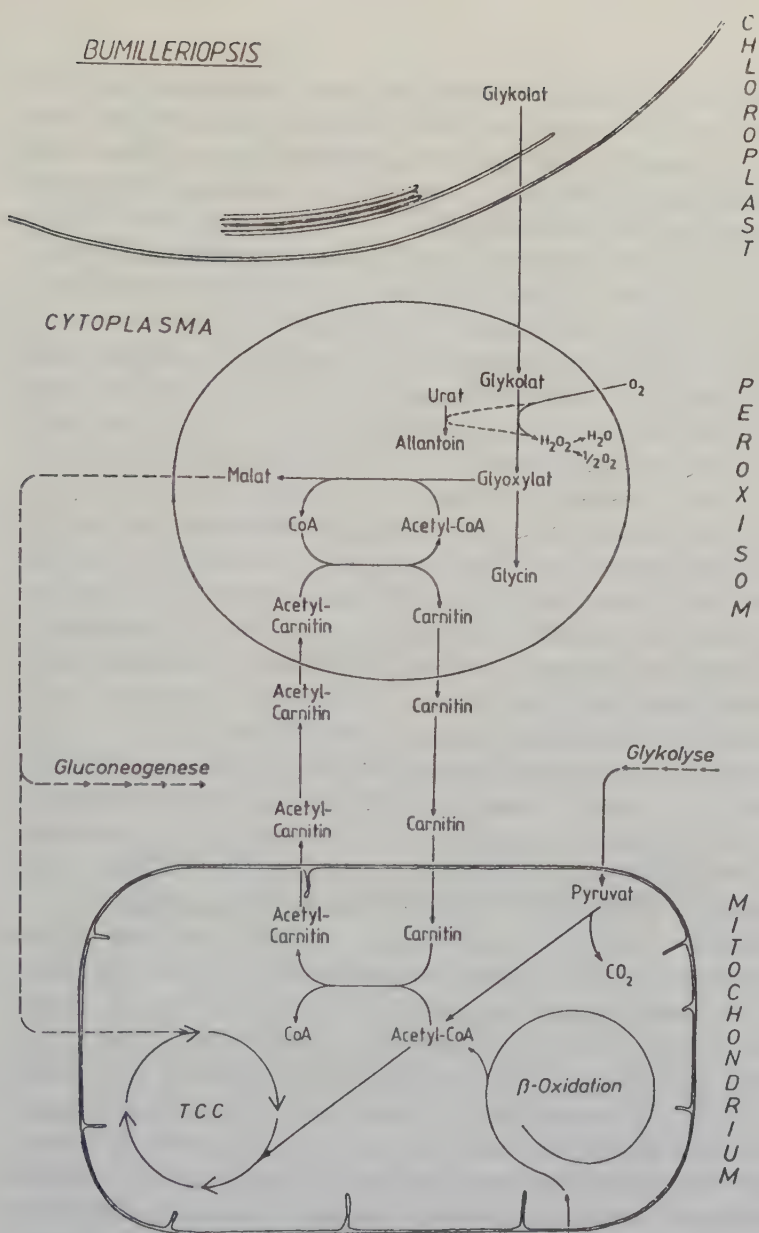


Abbildung 20: Mögliche Reaktionswege zum Umsatz von Glykolsäure in den Zellen von Bumilleriopsis

stattfindet. Als Transportform dient dabei vermutlich Acetylcarnitin, entsprechend den Befunden von EDWARDS et al. (1974), die einen erheblich geringeren Umsatz mit Acetyl-CoA/Carnitin als mit Acetylcarnitin/CoA an intakten Mitochondrien tierischer Zellen belegen.

Ein Transportmechanismus für Acetyl-CoA mit Hilfe der Carnitin-Acetyltransferase wurde für tierische Zellen bereits mehrfach postuliert (BRESSLER 1970, MARKWELL et al. 1976), wogegen über das Vorkommen einer Carnitin-Acetyltransferase bei Pflanzen, mit Ausnahme von Erbsenkotyledonen, nur negative Befunde vorliegen (MARKWELL et al. 1973, TOLBERT 1982). Die in den Mitochondrien der Erbsenkotyledonen gemessene Aktivität der Carnitin-Acetyltransferase (WOOD et al. 1983, McLAREN et al. 1985) ist jedoch mit etwa $0.5 \text{ nmol/min} \times \text{mg}$ Mitochondrienprotein äußerst gering (BURGESS & THOMAS 1986). Die bei Bumilleriopsis gemessenen Werte betragen im Vergleich dazu etwa $1500 \text{ nmol/min} \times \text{mg}$ Mitochondrienprotein. Zudem steht eine Charakterisierung der Carnitin-Acetyltransferase bei *Pisum* noch aus, so daß ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen an Bumilleriopsis nicht möglich ist. Untersuchungen zur Substratspezifität der mitochondrialen und peroxisomalen Carnitin-Acetyltransferase aus Bumilleriopsis ergaben eine ausgeprägte Affinität der Enzyme zu kurzkettigen CoA-Estern, so daß vorerst ungeklärt bleibt, auf welche Weise längerkettige Fettsäuren in die Mitochondrien gelangen.

Insgesamt ergibt sich, daß die Peroxisomen von Bumilleriopsis in den photosyntheseabhängigen Glykolatstoffwechsel eingeschaltet sind, dessen Ablauf sich jedoch erheblich von dem der höheren Pflanzen unterscheidet (Abb. 20). Der Umsatz von Glykolsäure zu Glycin entspricht dem Reaktionsablauf in den Blatt-Peroxisomen, wogegen der Metabolismus von Glykolat zu Malat in keinen der bisher untersuchten Peroxisomen nachgewiesen wurde. Unklar bleibt, welche Bedeutung der Synthese von Malat im Rahmen des Glykolatstoffwechsels bei Bumilleriopsis zukommt. Wird die spezifische Aktivität und die Substrataffinität der Glykolat-Oxidase und der Malatsynthetase berücksichtigt, so erscheint ein Zusam-

menspiel dieser beiden Enzyme auch bei geringem Substratan-
gebot möglich. Es bleibt jedoch zu bedenken, daß der weitere
Umsatz von Glyoxylat in der intakten Zelle stark vom Angebot
an Acetyl-CoA, der Verfügbarkeit von Aminogruppendonatoren
und dem Bedarf an Malat und Glycin abhängig sein wird.

Anhaltspunkte, die eine ähnliche Verknüpfung von Glykolat-
Umsatz und Malat-Synthese vermuten lassen, konnten bei
Chlorella sorokiniana erhalten werden (BEUDEKER & TABITA
1984). Bei dieser Alge wird Glykolat offensichtlich über
Glycin und Serin zu Glycerat metabolisiert, wenn die Anzucht
mit Nitrat als Stickstoffquelle erfolgt. Wird jedoch Nitrat
durch Ammonium ersetzt, so geht die Aktivität der für den
Umsatz von Glycin zu Hydroxypyruvat verantwortlichen Enzyme
zurück, während die spezifische Aktivität der Malatsynthetase
zunimmt. Die Autoren konnten die Bildung von Malat indirekt
nachweisen, nachdem einem Zellextrakt von *Chlorella*
sorokiniana Acetyl-CoA und Glyoxylat zugesetzt wurde. Über
entsprechende Untersuchungen mit Glykolat statt Glyoxylat als
Substrat liegen bei dieser Alge keine Ergebnisse vor. Die
intrazelluläre Lokalisation der Glykolat-Dehydrogenase
(BEUDEKER & TABITA 1983) und Malatsynthetase bleibt bei
Chlorella ebenfalls ungeklärt.

	Glyoxylat-Zyklus		Glykolat-Stoffwechsel		Urat-Stoffw.	β -Oxidation
	Malatsyn.	Isoc.-Lyase	Glyk.-Oxidase	HP-Reduktase	Uricase	
EUGLENA heterotroph	+	+	—	—	—	+
MOUCZOTIA	—	—	+	+	—	+
EREMOSPHAERA	—	—	—	—	+	+
BUMILLERIOPSIS	+	—	+	—	+	—

(nach Angaben von GRAVES & BECKER 1974, STABENAU & SÄFTEL 1981,
STABENAU et al. 1984a und b). (—) = nicht nachgewiesen

Abbildung 21: Enzymausstattung der Peroxisomen von
Bumilleriopsis und verschiedener Grünalgen

Für einen Vergleich der peroxisomalen Enzymausstattung von *Bumilleriopsis* mit der anderer Algen stehen nur begrenzt Ergebnisse zur Verfügung, da bisher lediglich aus einigen wenigen Algen Peroxisomen isoliert und biochemisch charakterisiert worden sind (Abb. 21).

Die Peroxisomen der Charophyceen *Mougeotia* entsprechen den Blatt-Peroxisomen höherer Pflanzen (STABENAU & SÄFTEL 1981, WINKLER et al. 1982, STABENAU 1984b), die sich durch das Vorkommen von Hydroxypyruvat-Reduktase und Serin-2-Oxoglutarat- bzw. Serin-Pyruvat-Aminotransferase von den Organellen aus *Bumilleriopsis* unterscheiden. Darüber hinaus konnten Enzyme der β -Oxidation in den Peroxisomen von *Mougeotia* nachgewiesen werden (STABENAU et al. 1984a), wogegen eine Carnitin-Acetyltransferase völlig fehlt (eigene Untersuchungen).

Bei der Chlorophyceen *Eremosphaera* lassen sich neben Enzymen der β -Oxidation nur Katalase und Uricase in den Peroxisomen nachweisen. Es fehlen Enzyme des Glykolatstoffwechsels und des Glyoxylat-Zyklus in diesen Organellen, so daß sie in die Gruppe der "unspezialisierten" Peroxisomen einzuordnen sind. Die Enzyme des Metabolismus von Glykolat zu Glycerat sind bei *Eremosphaera* ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert, wobei die Glykolsäure über eine Glykolat-Dehydrogenase oxidiert wird (STABENAU et al. 1984b). Im Unterschied zu *Bumilleriopsis* ließen sich bei dieser Alge sowohl in den Mitochondrien als auch in den Peroxisomen Enzyme der β -Oxidation nachweisen (STABENAU et al. 1984a).

Ein grundlegender Unterschied besteht zwischen den Microbodies von *Euglena gracilis* und den der oben genannten Arten, da den Organellen dieser Euglenophyceen offensichtlich das Enzym Katalase fehlt und sie somit definitionsgemäß nicht als Peroxisomen bezeichnet werden können (LORD & MERRETT 1971, COLLINS & MERRETT 1975). In den Microbodies von *Euglena* ließen sich alle notwendigen Enzyme für den Umsatz von Glykolat zu Glycin und von Serin zu Glycerat nachweisen. Die Glykolsäure wird bei dieser Alge jedoch über eine Glykolat-Dehydrogenase in den Microbodies oxidiert (COLLINS & MERRETT

1975, YOKOTA et al. 1978). Über die Kompartimentierung des Fettsäureabbaus liegen bei *Euglena* bisher nur Ergebnisse an heterotroph angezogenen Zellen vor, die darauf hinweisen, daß einige Enzyme der β -Oxidation zusammen mit denen des Glyoxylat-Zyklus in den Microbodies vorkommen (GRAVES & BECKER 1974). In dieser Hinsicht sind die Organellen aus *Euglena* den Glyoxysomen höherer Pflanzen ähnlich.

Über die intrazelluläre Lokalisation der β -Oxidation bei Algen und nicht-fettspeichernden Geweben höherer Pflanzen sind in der Literatur nur einige wenige Befunde vorhanden. Bei diesen Untersuchungen konnte jedoch stets eine Beteiligung der Peroxisomen am Fettsäureabbau belegt werden (GRAVES & BECKER 1974, GERHARDT 1983, STABENAU et al. 1984a, WOOD et al. 1986); lediglich *Bumilleriopsis* stellt bisher eine Ausnahme dar. - Befunde von PANTER & MUDD (1973) und THOMAS & McNEIL (1976), die die β -Oxidation ausschließlich als Bestandteil der Mitochondrien ausweisen, müssen aufgrund der fehlenden bzw. unzureichenden Trennung von Mitochondrien und Peroxisomen angezweifelt werden (siehe dazu GERHARDT 1983). -

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß durch den Nachweis der Leitenzyme Glykolat-Oxidase, Malatsynthetase und Uricase je ein Merkmal der Blatt-Peroxisomen, Glyoxysomen und "unspezialisierten" Microbodies bei *Bumilleriopsis* in einem Organell enthalten ist. (Anhaltspunkte, die auf eine Verteilung dieser drei Enzyme auf verschiedene Microbody-Populationen schließen lassen (vgl. dazu BEEVERS 1979 und WANNER & THEIMER 1982) wurden bei *Bumilleriopsis* auch nach Anwendung von Geschwindigkeits-Dichtegradientenzentrifugation nicht erhalten.) Andererseits können durch das Fehlen der Enzyme Hydroxypyruvat-Reduktase und Isocitrat-Lyase die Peroxisomen aus *Bumilleriopsis* nicht als Blatt-Peroxisomen bzw. Glyoxysomen angesehen werden.

In diesem Zusammenhang schien die Frage interessant, ob sich *Bumilleriopsis* aufgrund der beschriebenen Sonderstellung der Peroxisomen auch von anderen Vertretern der Xanthophyceen

abgrenzen läßt. Entsprechende Untersuchungen an vier weiteren Arten der Xanthophyceen ließen im Vergleich zu Bumilleriopsis keine wesentlichen Unterschiede in der Enzyenausstattung erkennen. Zudem konnten auch bei Vaucheria die Enzyme der β -Oxidation in den Mitochondrien und die des Glykolatstoffwechsels in den Peroxisomen nachgewiesen werden.

Die untersuchten gelb-grünen Algen sind z.T. völlig unterschiedlichen Organisationsstufen zuzuordnen und kommen in verschiedenen Lebensräumen vor. Daher belegen die erhaltenen Ergebnisse auch, daß die Art des Glykolatstoffwechsels nicht von diesen Faktoren abhängig sein kann. Aus diesem Grund erscheint die Annahme gerechtfertigt, daß bei den Peroxisomen der Xanthophyceen die Bildung von Malat im Rahmen des Glykolatstoffwechsels ein generelles Merkmal darstellt.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten in fünf Arten aus der Gruppe der Xanthophyceen Strukturen beobachtet werden, die die charakteristischen Merkmale der Microbodies besitzen. Diese Organellen weisen bei den untersuchten Xanthophyceen eine z.T. deutlich ausgeprägte Assoziation mit Mitochondrien und/oder Chloroplasten auf.
2. Die Peroxisomen der coccalen Alge *Bumilleriopsis filiformis* und einer aus dem Eulitoral der Nordseeküste isolierten *Vaucheria*-Art konnten mit Hilfe der isopyknischen Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden. Die biochemische Charakterisierung zeigte, daß diese Organellen eine ungewöhnliche Enzymausstattung besitzen.
3. In den Peroxisomen von *Bumilleriopsis* konnte das Leitenzym des Urat-Stoffwechsels, die Uricase, nachgewiesen werden.
4. Glykolsäure wird bei *Bumilleriopsis* und *Vaucheria* über eine H_2O_2 -bildende Oxidase in den Peroxisomen oxidiert.
5. Die bei der Oxidation von Glykolat entstehende Glyoxylsäure kann in den Peroxisomen mit Hilfe einer Glutamat-Glyoxylat-Aminotransferase zu Glycin umgesetzt werden.
6. Die für den Umsatz von Glycin zu Glycerat notwendigen Enzyme Hydroxypyruvat-Reduktase, Serin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase und Serinhydroxymethyltransferase konnten weder in den Peroxisomen noch in einem anderen Zellkompartiment nachgewiesen werden. Ein Stoffwechsel von Glykolsäure vergleichbar mit dem höherer Pflanzen ist somit bei diesen Algen nicht möglich.

7. In den Peroxisomen von Bumilleriopsis konnte neben dem blatt-peroxisomalen Leitenzym Glykolat-Oxidase das glyoxysomale Leitenzym Malatsynthetase nachgewiesen werden. Die Bildung von Malat aus Glykolat und Acetyl-CoA in den Peroxisomen ließ sich mit Hilfe von Markierungsversuchen belegen.
8. Da sich Isocitrat-Lyase bei Bumilleriopsis nicht nachweisen ließ, ist eine Umsetzung von Malat im Glyoxylat-Zyklus auszuschließen.
9. Die Peroxisomen von Bumilleriopsis besitzen keine Enzyme der β -Oxidation, vielmehr erfolgt der Fettsäureabbau bei dieser Alge ausschließlich in den Mitochondrien.
10. Ebenso wie bei der Alge Bumilleriopsis konnte auch in den anderen untersuchten Xanthophyceen das Vorkommen der Enzyme Glykolat-Oxidase, Uricase, Malat-Synthetase und Carnitin-Acetyltransferase festgestellt werden. Die Enzyme Hydroxypyruvat-Reduktase und Isocitrat-Lyase ließen sich in diesen Arten nicht nachweisen.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- Åberg, H. & Fries, L. - (1976) On cultivation of the alga VAUCHERIA DICHOTOMA in axenic culture.
Phycologia 15: 133 - 141
- Axelrod, B. & Beevers, H. - (1972) Differential response of mitochondrial and glyoxysomal citrate synthase to ATP.
Biochim. Biophys. Acta 256: 175 - 178
- Badour, S.S. & Waygood, E.R. - (1971) Glyoxylate carboxy-lyase in the unicellular green alga GLOEOMONAS spec.
Biochim. Biophys. Acta 242: 493 - 499
- Baker, C.J.L. - (1952) In: The Analyst 77: 340
- Beevers, H. - (1979) Microbodies in higher plants.
Ann. Rev. Plant Physiol. 30: 159 - 197
- Beevers, H. - (1982) Glyoxysomes in higher plants.
Ann. New York Acad. Sci. 386: 243 - 253
- Beezley, B.B.; Gruber, P.J. & Frederick, S.E. - (1976) Cytochemical localization of glycolate dehydrogenase in the mitochondria of CHLAMYDOMONAS.
Plant Physiol. 58: 315 - 319
- Belcher, J.H. & Miller, J.D.H. - (1960) Studies on the growth of Xanthophyceae in pure culture. IV. Nutritional types amongst the Xanthophyceae.
Arch. Mikrobiol. 36: 219 - 228
- Beudeker, R.F.; Kuenen, J.G. & Codd, G.A. - (1981) Glycollate metabolism in the obligate chemolithotroph THIOBACILLUS NEAPOLITANUS grown in continuous culture.
J. Gen. Microbiol. 126: 337 - 346
- Beudeker, R.F. & Tabita, F.R. - (1983) Control of photorespiratory glycolate metabolism in an oxygen-resistant mutant of CHLORELLA SOROKINIANA. J. Bacteriol. 155: 650 - 656
- Beudeker, R.F. & Tabita, F.R. - (1984) Glycolate metabolism is under nitrogen control in CHLORELLA.
Plant Physiol. 75: 516 - 520
- Bibby, B.T. & Dodge, J.D. - (1973) The ultrastructure and cytochemistry of microbodies in dinoflagellates.
Planta 112: 7 - 16

- Bieber, L.L.; Abraham, T. & Helmrath, T. - (1972) A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase. Anal. Biochem. 50: 509 - 518
- Bieglmayer, C.; Graf, J. & Ruis, H. - (1973) Membranes of glyoxysomes from castor bean endosperm. Eur. J. Biochem. 37: 553 - 562
- Björntorp, P. - (1966) The oxidation of fatty acids combined with albumin by isolated rat liver mitochondria. J. biol. Chem. 241: 1537 - 1543
- Blum, J.L. & Conover, J.T. - (1953) Salt marsh Vaucheriaceae. The Biol. Bull. 105: 395 - 401
- Blum, J.J. - (1973) Localization of some enzymes of β -oxidation of fatty acids in the peroxisomes of TETRAHYMENA. J. Protozool. 20: 688 - 692
- Böger, P. - (1964) Das Strukturprotein aus Chloroplasten einzelliger Grünalgen und seine Beziehung zum Chlorophyll. Flora 154: 174 - 211
- Böger, P. - (1971) Chloroplasts from BUMILLERIOPSIS FILIFORMIS. Meth. Enzymol. 23: 246 - 248
- Bold, H.C. & Wynne, H.J. - (1978) Introduction to the algae. Structure and reproduction. Prentice Hall, INC., Englewood cliffs, New Jersey.
- Bouck, G.R. - (1965) Fine structure and organelle association in brown algae. J. Cell Biol. 26: 523 - 537
- Bowden, L. & Lord, J.M. - (1978) Purification and comparative properties of microsomal and glyoxysomal malate synthase from castor bean endosperm. Plant Physiol. 61: 259 - 265
- Breidenbach, R.W. & Beevers, H. - (1967) Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particle from castor bean endosperm. Biochem. Biophys. Res. Comm. 27: 462 - 469
- Bremer, J. - (1977) Carnitine and its role in fatty acid metabolism. TIBS 2: 207 - 209
- Bremer, J. & Norum, K.R. - (1967a) The mechanism of substrate inhibition of palmitoyl coenzyme A: carnitine palmitoyltransferase by palmitoyl coenzyme A. J. biol. Chem. 242: 1744 - 1748

- Bremer, J. & Norum, K.R. - (1967b) Palmitoyl-CoA:carnitine O-palmitoyltransferase in the mitochondrial oxidation of palmitoyl-CoA. *Eur. J. Biochem.* 1: 427 - 433
- Bremer, J. & Osmundsen, H. - (1984) Fatty acid oxidation and its regulation. In: *Fatty acid metabolism and its regulation*, (ed. Numa, S.), S. 113 - 154, Elsevier, Amsterdam.
- Bressler, R. - (1970) Fatty acid oxidation. In: *Comp. Biochem. Bd. 18: Lipid Metabolism*. (ed. Florkin, M. & Stotz, E.H.); Elsevier Publ. Company, London.
- Brody, M. & White, J.E. - (1972) Environmental factors controlling enzymatic activity in microbodies and mitochondria of *EUGLENA GRACILIS*. *FEBS Lett.* 23: 149 - 151
- Brunold, C. & Schiff, J.A. - (1976) Studies of sulfate utilization of algae. 15. Enzymes of assimilatory sulfate reduction in *EUGLENA* and their cellular localization. *Plant Physiol.* 57: 430 - 436
- Burgess, N. & Thomas, D.R. - (1986) Carnitine acetyltransferase in pea cotyledon mitochondria. *Planta* 167: 58 - 65
- Calkins, V.P. - (1943) Microdetermination of glycolic and oxalic acids. *Anal. Chem.* 15: 762 - 763
- Casselton, P.J. - (1966) Chemo-organotrophic growth of Xanthophyceean algae. *New Phytol.* 65: 134 - 140
- Cattolico, R.A.; Boothroyd, J.C. & Gibbs, S.P. - (1976) Synchronous growth and plastid replication in the naturally wall-less alga *OLISTHODISCUS LUTEUS*. *Plant Physiol.* 57: 497 - 503
- Chase, J.F.A. - (1969) Carnitine acetyltransferase from pigeon breast muscle. *Meth. Enzymol.* 13: 387 - 393
- Chiriboga, J. - (1966) Purification and properties of oxalic acid oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 116: 516 - 523
- Codd, G.A.; Schmid, G.H. & Kowallik, W. - (1972) Enzymic evidence for peroxisomes in a mutant of *CHLORELLA VULGARIS*. *Arch. Mikrobiol.* 81: 264 - 272
- Codd, G.A.; Schmid, G.H. & Kowallik, W. - (1973) Further enzymatic studies and electron microscopy of the microbodies of a mutant of *CHLORELLA VULGARIS*. *Arch. Mikrobiol.* 92: 21 - 38

- Collins, N. & Merrett, M.J. - (1975) The localization of glycolate-pathway enzymes in EUGLENA.
Biochem. J. 148: 321 - 328
- Cooper, R.A. & Lloyd, D. - (1972) Subcellular fractionation of the colourless alga POLYTOMELLA CAECA by differential and zonal centrifugation.
J. Gen. Microbiol. 72: 59 - 70
- Cooper, T.G. - (1971) The activation of fatty acids in castor bean endosperm. J. biol. Chem. 246: 3451 - 3455
- Cooper, T.G. & Beevers, H. - (1969) β -oxidation in glyoxysomes from castor bean endosperm.
J. biol. Chem. 244: 3514 - 3520
- Curry, A.S. - (1959) Aminoacetone: its isolation and role in metabolism. Nature 183: 1051 - 1052
- Datta, P.K. & Meeuse, B.J.D. - (1955) Moss oxalic acid oxidase - A flavoprotein. Biochim. Biophys. Acta 17: 602 - 603
- DeDuve, C. & Baudhuin, P. - (1966) Peroxisomes (Microbodies and related particles). Physiol. Rev. 46: 323 - 357
- Dixon, G.H. & Kornberg, H.L. - (1959) Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle.
Biochem. J. 72: 3p
- Dixon, G.H. & Kornberg, H.L. - (1962) Malate synthetase from bakers yeast. Meth. Enzymol. 5: 633 - 637
- Dommes, V. & Kunau, W.H. - (1976) A convenient assay for acyl-CoA-dehydrogenase. Anal. Biochem. 71: 571 - 578
- Edwards, Y.H.; Chase, J.F.A.; Edwards, M.R. & Tubbs, P.K. - (1974) Carnitine acetyltransferase: the question of multiple forms. Eur. J. Biochem. 46: 209 - 215
- Ettl, H.; Gerloff, J. & Heynig, H. - (1978) Süßwasserflora von Mitteleuropa, Xanthophyceae, Teil 1 und 2, G. Fischer Verlag, Stuttgart.
- Ettl, H.; Müller, D.G.; Neumann, K.; v. Stosch, H.A. & Weber, W. - (1967) Experimentelle Untersuchungen zur Fortpflanzung (Xanthophyceen) In: Handbuch d. Pflanzenphysiologie Bd. 18, (ed. Ruhland, W.) Springer Verlag, Berlin.
- Falk, H. - (1967) Zum Feinbau von BOTRYDIUM GRANULATUM.
Arch. Mikrobiol. 58: 212 - 227
- Falk, H. & Kleinig, H. - (1968) Feinbau und Carotinoide von TRIBONEMA. Arch. Mikrobiol. 61: 347 - 362

- Feierabend, J. & Beevers, H. - (1972) Developmental studies on microbodies in wheat leaves. II. Ontogeny of particulate enzyme associations. *Plant Physiol.* 49: 33 - 39
- Floyd, L.G. & Salisbury, J.L. - (1977) Glycolate dehydrogenase in primitive green algae. *Amer. J. Bot.* 64: 1294 - 1296
- Foo, S.K.; Badour, S.S. & Waygood, E.R. - (1971) Regulation of isocitrate lyase from autotrophic and photoheterotrophic cultures of *GLOEOMONAS* spec. *Can. J. Bot.* 49: 1647 - 1653
- Frederick, S.E. & Newcomb, E.H. - (1969) Microbody-like organelles in leaf cells. *Science* 163: 1353 - 1355
- Frederick, S.E. & Newcomb, E.H. - (1971) Ultrastructure and distribution of microbodies in leaves of grasses with and without CO₂-photorespiration. *Planta* 96: 152 - 174
- Frederick, S.E.; Newcomb, E.H.; Vigil, E.L. & Wergin, W.P. - (1968) Fine-structural characterization of plant microbodies. *Planta* 81: 229 - 252
- Frederick, S.E.; Gruber, P.J. & Tolbert, N.E. - (1973) The occurrence of glycolate dehydrogenase and glycolate oxidase in green plants. *Plant Physiol.* 52: 318 - 323
- Frederick, S.E.; Gruber, P.J. & Newcomb, E.H. - (1975) Plant microbodies. *Protoplasma* 84: 1 - 29
- Fries, L. - (1963) On the cultivation of axenic red algae. *Physiol. Plantarum* 16: 695 - 708
- Frigerio, N.A. & Harbury, H.A. - (1958) Preparation and some properties of crystalline glycolic acid oxidase of spinach. *J. biol. Chem.* 231: 135 - 145
- Frisell, W.R. & Mackenzie, C.G. - (1970) Sarcosine dehydrogenase and dimethyl-glycine dehydrogenase. *Meth. Enzymol.* 17a: 976 - 977
- Fritz, I.B.; Schultz, S.K. & Srere, P.A. - (1963) Properties of partially purified carnitine acetyltransferase. *J. biol. Chem.* 238: 2509 - 2517
- Gerhardt, B. - (1971) Zur Lokalisation von Enzymen der Microbodies in *POLYTOMELLA CAECA*. *Arch. Mikrobiol.* 80: 205 - 218
- Gerhardt, B. - (1973) Untersuchungen zur Funktionsänderung der Microbodies in den Keimblättern von *HELIANTHUS ANNUUS*. *Planta* 110: 15 - 28

- Gerhardt, B. - (1974) Zur Funktion der Microbodies.
biuz 4/6: 169 - 178
- Gerhardt, B. - (1978) Microbodies/Peroxisomen pflanzlicher Zellen. Cell Biol. Monographs 5, Springer Verlag, Wien.
- Gerhardt, B. - (1981) Enzyme activities of the β -oxidation pathway in spinach leaf peroxisomes.
FEBS Lett. 126: 71 - 73
- Gerhardt, B. - (1983) Localization of β -oxidation enzymes in peroxisomes isolated from nonfatty plant tissues.
Planta 159: 238 - 246
- Giovanelli, J. - (1966) Oxalyl-coenzyme A synthetase from pea seeds. Biochim. Biophys. Acta 118: 124 - 137
- Godavari, H.R.; Badour, S.S. & Waygood, E.R. - Isocitrate lyase in green leaves. Plant Physiol. 51: 863 - 867
- Godel, H.; Graser, P.; Földi, P.; Pfaender, P.; Fürst, P. - (1984) Measurement of free amino acids in human biological fluids by HPLC. J. Chromatogr. 297: 49 - 61
- Graves, L.B.; Trelease, R.N. & Becker, W.M. - (1971) Particulate nature of glycolate dehydrogenase in EUGLENA: Possible localization in microbodies.
Biochem. biophys. Res. Comm. 44: 280 - 286
- Graves, L.B.; Trelease, R.N.; Grill, A. & Becker, W.M. - (1972) Localization of glyoxylate cycle enzymes in glyoxysomes in EUGLENA. J. Protozool. 19: 527 - 532
- Graves, L.B. & Becker, W.M. - (1974) Beta-oxidation in glyoxysomes from EUGLENA. J. Protozool. 21: 771 - 773
- Groot, P.H.E. - (1975) The activation of short-chain fatty acids by the soluble fraction of guinea-pig heart and liver mitochondria: The search for a distinct propionyl-CoA synthetase.
Biochim. Biophys. Acta 380: 12 - 20
- Groot, P.H.E. - (1976) Acyl-CoA synthetases in guinea-pig liver mitochondria: Purification and characterization of a distinct propionyl-CoA synthetase.
Biochim. Biophys. Acta 441: 260 - 267
- Gross, W. - (1984) Der Glykolatstoffwechsel bei Grünalgen aus phylogenetischer Sicht. Diplomarbeit
- Gross, W.; Winkler, U. & Stabenau, H. - (1985) Characterization of peroxisomes from the alga BUMILLERIOPSIS FILIFORMIS. Plant Physiol. 77: 296 - 299

- Gruber, P.J.; Becker, W.M. & Newcomb, E.H. - (1972) The occurrence of microbodies and peroxisomal enzymes in achlorophyllous leaves. *Planta* 105: 114 - 138
- Gruber, P.J.; Becker, W.M. & Newcomb, E.H. - (1973) The development of microbodies and peroxisomal enzymes in greening bean leaves. *J. Cell Biol.* 56: 500 - 518
- Gupta, N.K. & Vennesland, B. - (1966) Glyoxylate carboligase from *ESCHERICHIA COLI*. *Meth. Enzymol.* 9: 693 - 697
- Haigh, W.G. & Beevers, H. - (1964a) The glyoxylate cycle in *POLYTOMELLA CAECA*. *Arch. Biochem. Biophys.* 107: 152 - 157
- Haigh, W.G. & Beevers, H. - (1964b) The occurrence and assay of isocitrate lyase in algae. *Arch. Biochem. Biophys.* 107: 147 - 151
- Halliwel, B. & Butt, V.S. - (1974) Oxidative decarboxylation of glycollate and glyoxylate by leaf peroxisomes. *Biochem. J.* 138: 217 - 224
- Halperin, M.B. & Pande, S.V. - (1979) Fatty acyl group transport into mitochondria: Carnitine palmitoyl transferases and the carnitine-acylcarnitine translocase. *Meth. Enzymol.* 56: 368 - 378
- Hanks, J.F.; Tolbert, N.E. & Schubert, K.R. - (1981) Localization of enzymes of ureide biosynthesis in peroxisomes and microsomes of nodules. *Plant Physiol.* 68: 65 - 69
- Havir, E.A. - (1983) Evidence for the presence in tobacco leaves of multiple enzymes for the oxidation of glycollate and glyoxylate. *Plant Physiol.* 71: 874 - 878
- Havir, E.A. - (1984) Oxalate metabolism by tobacco leaf discs. *Plant Physiol.* 75: 505 - 507
- Heady, J.E. & Kerr, S.J. - (1973) Purification and characterization of glycine N-methyltransferase. *J. biol. Chem.* 248: 69 - 72
- Heldt, H.W. - (1976) Transport of metabolites between cytoplasm and the mitochondrial matrix. *Enc. Plant Physiol.* 3: 235 - 254
- Hesse, M. - (1974) Wachstum und Synchronisierung der Alge *BUMILLERIOPSIS FILIFORMIS* (Xanthophyceae). *Planta* 120: 135 - 146.

- Hibberd, D.J. & Leedale, G.F. - (1971) Cytology and ultra-structure of the Xanthophyceae. II. The zoospore and vegetative cell of coccoid forms, with special reference to *OPHIOCYTIUM MAJUS*. Br. phycol. J. 6: 1 - 23
- Hock, B. - (1969) Hemmung der Isocitrat-Lyase bei Wassermelonen-Keimlingen durch Weißlicht. Planta 85: 340 - 350
- Hoppel, C.L. & Tomec, R.J. - (1972) Carnitine palmityltransferase. J. biol. Chem. 247: 832 - 841
- Hoskins, D.D. & Mackenzie, C.G. - (1961) Solubilisation and electron transfer flavoprotein requirement of mitochondrial sarcosine dehydrogenase and dimethylglycine dehydrogenase. J. biol. Chem. 236: 177 - 183
- Hood, D.W. & Park, K. - (1962) Bicarbonate utilization by marine phytoplankton in photosynthesis. Physiol. Plantarum 15: 273 - 282
- Hryb, D.J. & Hogg, F.J. - (1979) Chain length specifications of peroxisomal and mitochondrial β -oxidation in rat liver. Biochem. Biophys. Res. Comm. 87: 1200 - 1206
- Huang, A.H.C. & Beevers, H. - (1971) Isolation of microbodies from plant tissues. Plant Physiol. 48: 637 - 641
- Huang, A.H.C. & Beevers, H. - (1973) Localisation of enzymes within microbodies. J. Cell Biol. 58: 379 - 389
- Huang, A.H.C.; Trelease, R.N. & Moore, T.S. - (1983) Plant peroxisomes. Academic Press, New York
- Hustede, H. - (1957) Untersuchungen über die stoffliche Beeinflussung der Entwicklung von *STIGEOCLONIUM FALKLANDICUM* und *VAUCHERIA SESSILIS* durch Tryptophan-abkömmlinge. Biol. Zentralbl. 76: 555 - 595
- Hutton, D. & Stumpf, P.K. - (1969) Fat metabolism in higher plants. Plant Physiol. 44: 508 - 516
- Jakoby, W.B.; Ohmura, E. & Hayashi, O. - (1956) Enzymatic decarboxylation of oxalic acid. J. biol. Chem. 222: 435 - 445
- James, L. & Schwartzbach, S.D. - (1982) Differential regulation of phosphoglycolate and phosphoglycerate phosphatases in *EUGLENA*. Plant Sci. Lett. 27: 223 - 232
- John, P.C.L. & Syrett, P.J. - (1967) The purification and properties of isocitrate lyase from *CHLORELLA*. Biochem. J. 105: 409 - 515

- John, P.C.L. & Syrett, P.J. - (1968) The inhibition, by intermediary metabolites, of isocitrate lyase from *CHLORELLA PYRENOIDOSA*. *Biochem. J.* 110: 481 - 484
- Jones, R.F.; Speer, H.L. & Kury, W. - (1963) Studies on the growth of the red alga *PORPHYRIDIVM CRUENTUM*. *Physiol. Plantarum* 16: 636 - 643
- Kagawa, T. & Beevers, H. - (1975) The development of microbodies (glyoxysomes and leaf peroxisomes) in cotyledons of germinating watermelon seedlings. *Plant Physiol.* 55: 258 - 264
- Kawamoto, S.; Ueda, M.; Nozaki, C.; Yamamura, M.; Tanaka, A. & Fukui, S. - (1978) Localization of carnitine acetyltransferase in peroxisomes and in mitochondria of n-alkane-grown *CANDIDA TROPICALIS*. *FEBS Lett.* 96: 37 - 40
- Kindl, H. & Majunke, G. - (1973a) Glyoxysomale Enzyme in Laubblättern von *LENS CULINARIS*. *Z. Physiol. Chem.* 354: 999 - 1005
- Kindl, H. & Majunke, G. - (1973b) Untersuchungen zur biochemischen Charakterisierung von Mikrokörpern in Keimblättern von *LENS CULINARIS*. *Z. Physiol. Chem.* 354: 987 - 998
- Kisaki, T.A. & Tolbert, N.E. - (1970) Glycine as a substrate for photorespiration. *Plant Cell Physiol.* 11: 247 - 258
- Koch, O.G. & Koch-Dedic, G.A. - (1974) Phosphovanadomolybdänsäure-Bestimmung. In: *Handbuch der Spurenanalyse*, 2. Aufl.; Seite 900
- Kohn, L.D. & Jakoby, W.B. - (1966) Hydroxypyruvate reductase (*PSEUDOMONAS*). *Meth. Enzymol.* 9: 229 - 232
- Kohn, L.D. & Warren, W.A. - (1970) The kinetic properties of spinach leaf glyoxylic acid reductase. *J. biol. Chem.* 245: 3831 - 3839
- Krakow, G.; Barkulis, S.S. & Hayashi, J.A. - (1961) Glyoxylic acid carboligase: An enzyme present in glycolate-grown *ESCHERICHIA COLI*. *J. Bacteriol.* 81: 509 - 518
- League, E.A. & Greulach, V.A. - (1955) Effects of daylength and temperature on the reproduction of *VAUCHERIA SESSILIS*. *Bot. Gaz.* 117: 45 - 51
- Lewis, P.R. & Knight, D.P. - (1977) Staining methods for sectioned material. (S. 276 - 278) North-Holland Publ. Company, Amsterdam.

- Liang, Z.; Yu, C. & Huang, A.H.C. - (1982) Isolation of spinach leaf peroxisomes in 0.25 molar sucrose solution by Percoll density gradient centrifugation.
Plant Physiol. 70: 1210 - 1212
- Lord, J.M. & Merrett, M.J. - (1971) The intracellular localization of glycolate oxidoreductase in EUGLENA GRACILIS.
Biochem. J. 124: 275 - 281
- Lowry, O.H.; Rosebrough, A.L.; Farr, A.L. & Randall, R.J. - (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent.
J. biol. Chem. 193: 265 - 275
- Lück, H. - (1957) Catalase. In: Methods of enzymatic analysis (ed. Bergmeyer, H.U.), Academic Press, New York.
Seite 885 - 894
- Lui, N.S.T.; Roels, O.A.; Trout, M.E. & Anderson, O.R. - (1968) Subcellular distribution of enzymes in OCHROMONAS MALHAMENSIS. J. Protozool. 15: 536 - 542
- Mackenzie, C.G. & Hoskins, D.D. - (1962) Sarcosine dehydrogenase.
Meth. Enzymol. 5: 738 - 739
- Mahler, H.R.; Wakil, S.J. & Bock, R.M. - (1953) Studies on fatty acid oxidation. 1. Enzymatic activation of fatty acids.
J. biol. Chem. 204: 453 - 467
- Manton, I. - (1961) Observations on phragmosomes.
J. Exp. Bot. 12: 108 - 113
- Markwell, M.A.K.; McGroarty, E.J.; Bieber, L.L. & Tolbert, N.E. - (1973) The subcellular distribution of carnitine acyltransferases in mammalian liver and kidney.
J. biol. Chem. 218: 3426 - 3432
- Markwell, M.A.K.; Tolbert, N.E. & Bieber, L.L. - (1976) Comparison of the carnitine acyltransferase activities from rat liver peroxisomes and microsomes.
Arch. Biochem. Biophys. 176: 479 - 488
- Massalski, A. & Leedale, G.F. - (1969) Cytology and ultrastructure of the Xanthophyceae. I. Comparative morphology of the zoospores of BUMILLERIA SICULA and TRIBONEMA VULGARE. Br. phycol. J. 4: 159 - 180
- McFadden, B.A. - (1969) Isocitrate lyase.
Meth. Enzymol. 13: 163 - 170
- McGilvray, D. & Morris, J.G. - (1971) Aminoacetone synthetase (ARTHROBACTER). Meth. Enzymol. 17b: 585 - 589

- McLachlan, J. - (1964) Some considerations on the growth of marine algae in artificial medium.
Can. J. Microbiol. 10: 769 - 782
- McLaren, I.; Wood, C.; Jalil, M.N.H.; Yong, B.C.S. & Thomas, D.R. - (1985) Carnitine acetyltransferases in chloroplasts of *PISUM SATIVUM*. *Planta* 163: 197 - 200
- McNeil, P.H. & Thomas, D.R. - (1976) The effect of carnitine on palmitate oxidation by pea cotyledon mitochondria.
J. Exp. Bot. 27: 1163 - 1180
- Miernyk, J.A. & Trelease, R.N. - (1981) Control of enzyme activities in cotton cotyledons during maturation and germinating. *Plant Physiol.* 67: 341 - 346
- Miernyk, J.A.; Thomas, J. & Trelease, R.N. - (1982) A novel role for peroxisomes in oilseed development.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 386: 426 - 429
- Moestrup, O. - (1974) Ultrastructure of the scale-covered zoospores of the green alga *CHAETOSPHAERIDIUM*, a possible ancestor of the higher plants and bryophytes.
Biol. J. Linn. Soc. 6: 111 - 125
- Mollenhauer, H.H.; Morre, D.J. & Kelly, A.G. - (1966) The widespread occurrence of plant cytosomes resembling animal microbodies. *Protoplasma* 62: 44 - 52
- Motokawa, Y. & Kikuchi, G. - (1969) Glycine metabolism by rat liver mitochondria.
Arch. Biochem. Biophys. 135: 402 - 409
- Müller, M.; Hogg, J.F. & DeDuve, C. - (1968) Distribution of tricarboxylic acid cycle enzymes and glyoxylate cycle enzymes between mitochondria and peroxisomes in *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*.
J. Biol. Chem. 243: 5385 - 5395
- Muto, S. & Beevers, H. - (1974) Lipase activities in castor bean endosperm during germination.
Plant Physiol. 54: 23 - 28
- Nelson, E.B. & Tolbert, N.E. - (1970) Glycolate dehydrogenase in green algae. *Arch. Biochem. Biophys.* 141: 102 - 110
- Nilshammar, M. & Wallis, B. - (1974) Electron microscope studies on cell differentiation in synchronized cultures of the green alga *SCENEDESMUS*. *Protoplasma* 79: 317 - 332
- Norris, R.E. & Pearson, B.R. - (1975) Fine structure of *PYRAMONAS PARKEAE*. *Arch. Protistenk.* 117: 192 - 213

- Numa, S. - (1984) Fatty acid metabolism and its regulation.
New Comp. Biochem. Vol. 7, Elsevier, Amsterdam.
- Oakley, B.R. & Dodge, J.D. - (1974) The ultrastructure and cytochemistry of microbodies in PORPHYRIDIIUM.
Protoplasma 80: 233 - 244
- Oliver, D.J. - (1979) Mechanism of decarboxylation of glycine and glycolate by isolated soybean cells.
Plant Physiol. 64: 1048 - 1052
- Oliver, D.J. - (1981) Role of glycine and glyoxylate decarboxylation in photorespiratory CO₂ release.
Plant Physiol. 68: 1031 - 1034
- Osmundsen, H. & Neat, C.E. - (1979) Regulation of peroxisomal fatty acid oxidation. FEBS Lett. 107: 81 - 83
- Overath, P. & Raufuss, E.-M. - (1967) The induction of the enzymes of fatty acid degradation in ESCHERICHIA COLI.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 29: 28 - 33
- Pande, S.V. & Mead, J.F. - (1968) Long chain fatty acid activation in subcellular preparations from rat liver.
J. Biol. Chem. 243: 352 - 361
- Panter, R.A. & Mudd, J.B. - (1973) Some aspects of carnitine metabolism in Avocado (PERSEA AMERICANA).
Biochem. J. 134: 655 - 658
- Parsons, T.R. & Strickland, J.D.H. - (1963) Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids.
J. mar. Res. 21: 155 - 163
- Paul, J.S.; Sullivan, C.W. & Volcani, B.E. - (1975) Photorespiration in diatoms. Mitochondrial glycolate dehydrogenase in CYLINDROTHECA FUSIFORMIS and NITZSCHIA ALBA. Arch. Biochem. Biophys. 169: 152 - 159
- Paul, J.S. & Volcani, B.E. - (1976) Photorespiration in diatoms. IV. Two pathways of glycolate metabolism in synchronized cultures of CYLINDROTHECA FUSIFORMIS.
Arch. Microbiol. 110: 247 - 252
- Pecora, R.A. & Rhodes, R.G. - (1971) A comparative study of growth in BUMILLERIOPSIS FILIFORMIS, B. PETERSENIANA, and PSEUDOBUMILLERIOPSIS PYRENIDOSA.
Can. J. Bot. 50: 337 - 341

- Quayle, J.R.; Keech, D.B. & Taylor, G.A. - (1961) Carbon assimilation by *PSEUDOMONAS OXALATICUS*. 4. Metabolism of oxalate. *Biochem. J.* 78:225 - 236
- Ramsay, R.R. & Tubbs, P.K. - (1975) The mechanism of fatty acid uptake by heart mitochondria: an acylcarnitine-carnitine exchange. *FEBS Lett.* 54: 21 - 25
- Redgwell, R.J. - (1980) Fractionation of plant extracts using ion-exchange sephadex. *Anal. Biochem.* 107: 44 - 50
- Reynolds, E.S. - (1963) The use of lead citrate at high pH as an electrone-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17: 208 - 212
- Rhodin, J. - (1954) Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of mouse kidney. Dissertation, Stockholm.
- Richardson, K.E. & Tolbert, N.E. - (1961) Oxidation of glyoxylic acid to oxalic acid by glycolic acid oxidase. *J. biol. Chem.* 236: 1280 - 1284
- Richter, G. - (1982) Stoffwechselphysiologie der Pflanzen. 4. Auflage, G. Thieme Verlag, Stuttgart
- Rieth, A. - (1976) Beobachtungen an Langzeitkulturen von *VAUCHERIA*, Wachstumsintensität und Wasserspeicherung. *Kulturpflanze* 24: 365 - 378
- Rossi, C.R.; Galzigna, L.; Alexandre, A. & Gibson, D.M. - (1967) Oxidation of long chain fatty acids by rat liver mitochondria. *J. biol. Chem.* 242: 2102 - 2110
- Ruis, H. - (1971) Isolation and characterisation of peroxisomes from potato tubers. *Z. Physiol. Chem.* 352: 1105 - 1112
- Schnarrenberger, C.; Oeser, A. & Tolbert, N.E. - (1971) Development of microbodies in sunflower cotyledons and castor bean endosperm during germination. *Plant Physiol.* 48: 566 - 574
- Schulte, H. - (1964) Beiträge zur Cytologie von *VAUCHERIA*. *Protoplasma* 58: 227 - 249
- Semadeni, E.G. - (1967) Enzymatische Charakterisierung der Lysosomenäquivalente (Sphärosomen) von Maiskeimlingen. *Planta* 72: 91 - 118
- Silverberg, B.A. - (1975) An ultrastructural and cytochemical characterisation of microbodies in the green algae. *Protoplasma* 83: 269 - 295

- Somerville, C.R. & Ogren, W.L. - (1981) Photorespiration-deficient mutants of *ARABIDOPSIS THALIANA* lacking mitochondrial serine transhydroxymethylase activity. *Plant Physiol.* 67: 666 - 671
- Spurr, A.R. - (1969) A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26: 31 - 34
- Srivastava, S.K. & Krishnan, P.S. - (1962) An oxalic acid oxidase in the leaves of *BOUGAINVILLEA SPECTABILIS*. *Biochem. J.* 85: 33 - 38
- Stabenau, H. - (1969) Der Einfluß von Licht und Acetat auf *CHLOROGONIUM ELONGATUM*. Dissertation, Göttingen.
- Stabenau, H. - (1974a) Verteilung von Microbody-Enzymen aus *CHLAMYDOMONAS* in Dichtegradienten. *Planta* 118: 35 - 42
- Stabenau, H. - (1974b) Localization of enzymes of glycolate metabolism in the alga *CHLOROGONIUM ELONGATUM*. *Plant Physiol.* 54: 921 - 924
- Stabenau, H. - (1975) Zur Lokalisation von Glykolsäure-Oxidase in *SPIROGYRA*. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 88: 469 - 471
- Stabenau, H. - (1976) Microbodies from *SPIROGYRA*. *Plant Physiol.* 58: 693 - 695
- Stabenau, H. - (1978) Wachstum von *MOUGEOTIA* in der Durchlüftungskultur. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 91: 251 - 255
- Stabenau, H. - (1984a) Struktur und Funktion von Peroxisomen verschiedener Algen. *Mitteilungsband der Botanikertagung in Wien.* (ed. Ehrendorfer, F.) S. 101
- Stabenau, H. - (1984b) Microbodies in different algae. In: *Compartments in algal cells and their interaction.* (ed. Wiessner, W.; Robinson, D. & Starr, R.C.) Springer Verlag, Berlin
- Stabenau, H. & Beevers, H. - (1974) Isolation and characterization of microbodies from the alga *CHLOROGONIUM ELONGATUM*. *Plant Physiol.* 53: 866 - 869
- Stabenau, H. & Säftel, W. - (1981) Localization of enzymes of the glycolate metabolism in *MOUGEOTIA*. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 94: 59 - 64
- Stabenau, H. & Säftel, W. - (1982) A peroxisomal glycolate oxidase in the alga *MOUGEOTIA*. *Planta* 154: 165 - 167

- Stabenau, H.; Winkler, U. & Säftel, W. - (1984a) Enzymes of β -oxidation in different types of algal microbodies. *Plant Physiol.* 75: 531 - 533
- Stabenau, H.; Winkler, U. & Säftel, W. - (1984b) Mitochondrial metabolism of glycolate in the alga *EREMOSPHAERA VIRIDIS*. *Z. Pflanzenphysiol.* 114: 413 - 420
- Stewart, K.D.; Floyd, G.L.; Mattox, K.R. & Davis, M.E. - (1972) Cytochemical demonstration of a single peroxisome in a filamentous green alga. *J. Cell Biol.* 54: 431 - 434
- Stewart, W.D.P. - (1974) *Algal physiology and biochemistry*. Botanical Monographs Vol. 10, Blackwell Scientific Publ., Oxford.
- Tanaka, H. & Stadtman, T.G. - (1979) Selenium-dependent clostridial glycine reductase. *J. biol. Chem.* 254: 447 - 452
- Theimer, R.R. - (1976) A specific inactivator of glyoxysomal isocitrate lyase from sunflower cotyledons. *FEBS Lett.* 62: 297 - 299
- Thomas, D.R. & McNeil, P.H. - (1976) The effect of carnitine on the oxidation of saturated fatty acids by pea cotyledon mitochondria. *Planta* 132: 61 - 63
- Thomas, D.R. & Wodd, C. - (1982) Oxidation of acetate, acetyl CoA and acetylcarnitine by pea mitochondria. *Planta* 154: 145 - 149
- Thomas, D.R. & Wood, C. - (1986) The two β -oxidation sites in pea cotyledons. Carnitine palmitoyltransferase: Location and function in pea mitochondria. *Planta* 168: 261 - 266
- Thomas, J. & Trelease, R.N. - (1981) Cytochemical localization of glycolate oxidase in microbodies (glyoxysomes and peroxisomes) of higher plant tissues with the $CeCl_3$ technique. *Protoplasma* 108: 39 - 53
- Thornton, R.M. & Thimann, K.V. - (1964) On a crystal-containing body in cells of the oat coleoptile. *J. Cell Biol.* 20: 345 - 350
- Titus, D.E.; Hondred, D. & Becker, W.M. - (1983) Purification and characterization of hydroxypyruvate reductase from cucumber cotyledons. *Plant Physiol.* 72: 402 - 408
- Tolbert, N.E. - (1971) Microbodies - Peroxisomes and Glyoxysomes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 22: 45 - 74

- Tolbert, N.E. - (1982) Leaf peroxisomes.
Ann. New York Acad. Sci. 386: 254 - 268
- Tolbert, N.E. & Zill, L.P. - (1956) Excretion of glycolic acid by algae during photosynthesis.
J. biol. Chem. 222: 895 - 906
- Tolbert, N.E.; Oeser, A.; Kisaki, T.; Hageman, R.H. & Yamazaki, R.K. - (1968) Peroxisomes from spinach leaves containing enzymes related to glycolate metabolism.
J. biol. Chem. 243: 5179 - 5184
- Tolbert, N.E.; Yamazaki, R.K. & Oeser, A. - (1970) Localization and properties of hydroxypyruvate and glyoxylate reductases in spinach leaf particles.
J. biol. Chem. 245: 5129 - 5136
- Trainor, F.R. - (1978) Introductory phycology.
John Wiley & Sons, New York.
- Trelease, R.N.; Becker, W.M.; Gruber, P.J. & Newcomb, E.H. - (1971) Microbodies (glyoxysomes and peroxisomes) in cucumber cotyledons. Correlative biochemical and ultrastructural study in light- and dark-grown seedlings.
Plant Physiol. 48: 461 - 475
- Trelease, R.N.; Becker, W.M. & Burke, J.J. - (1974) Cytochemical localisation of malate synthase in glyoxysomes.
J. Cell Biol. 60: 483 - 495
- Turner, D.C. & Stradtman, T.C. - (1973) Purification of protein components of the clostridial glycine reductase system and characterization of protein A as a selenoprotein.
Arch. Biochem. Biophys. 154: 367
- Tzagoloff, A. - (1982) Mitochondria.
Plenum Press, New York
- Van Tol, A. & Hülsmann, W.C. - (1969) The localization of palmitoyl-CoA: carnitine palmitoyltransferase in rat liver. Biochim. Biophys. Acta 189: 342 - 353
- Vigil, E.L. - (1970) Cytochemical and developmental changes in microbodies (glyoxysomes) of castor bean endosperm.
J. Cell Biol. 46: 435 - 454
- Vigil, E.L. - (1973) Structure and function of plant microbodies.
Sub-Cell. Biochem. 2: 237 - 285

- Walton, N.J. - (1982) Glyoxylate decarboxylation during glycollate oxidation by pea leaf extracts: significance of glyoxylate and extract concentration.
 Planta 155: 218 - 224
- Walton, N.J. & Butt, V.S. - (1981) Metabolism and decarboxylation of glycollate and serine in leaf peroxisomes.
 Planta 153: 225 - 231
- Wanner, G. & Theimer, R.R. - (1982) Two types of microbodies in NEUROSPORA CRASSA.
 Ann. New York Acad. Sci. 386: 269 - 284
- Weinhouse, S.; Millington, R.H. & Strassman, M. - (1951) Incorporation of glycine carbon into yeast lipids.
 J. Amer. Chem. Soc. 73: 1421 - 1423
- Werner, H. - (1982) Biologische Versuchsobjekte.
 G. Fischer Verlag, Stuttgart.
- West, D.W.; Chase, J.F.A. & Tubbs, P.K. - (1971) The separation and properties of two forms of carnitine palmitoyltransferase from ox liver mitochondria.
 Biochem. Biophys. Res. Comm. 42: 912 - 918
- White, J.E. & Brody, M. - (1974) Enzymatic characterization of sucrose-gradient microbodies of dark-grown, greening and continuously light-grown EUGLENA GRACILIS.
 FEBS Lett. 40: 325 - 330
- Winkler, U.; Säftel, W. & Stabenau, H. - (1982) Studies on the aminotransferases participating in the glycolate metabolism of the alga MOUGEOTIA.
 Plant Physiol. 70: 340 - 343
- Wittels, B. & Blum, J.J. - (1968) Carnitine and carnitine palmitoyltransferase in EUGLENA growing with palmitate as a sole carbon source.
 Biochim. Biophys. Acta 152: 220 - 223
- Wolf, J. - (1955) Nichtflüchtige Mono-, Di- und Tricarbonsäuren.
 In: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse Bd. II, (ed. Paech, K. & Tracey, M.V.), Springer Verlag, New York
- Wood, C.; Jalil, M.N.H.; Ariffin, A.; Yong, B.C.S. & Thomas, D.F. - (1983) Carnitine short-chain acyltransferase in pea mitochondria. Planta 158: 175 - 178

- Wood, C.; Jalil, M.N.H.; McLaren, I.; Yong, B.C.S.; Ariffin, A.; McNeil, P.H.; Burgess, N. & Thomas, D.R. - (1984) Carnitine long-chain acyltransferase and oxidation of palmitate, palmitoyl coenzyme A and palmitoylcarnitine by pea mitochondria preparations. *Planta* 161: 255 - 260
- Wood, C.; Burgess, N. & Thomas, D.R. - (1986) The dual location of β -oxidation enzymes in germinating pea cotyledons. *Planta* 167: 54 - 57
- Yamamoto, Y. & Beevers, H. - (1961) Purification and properties of malate synthetase from castor beans. *Biochim. Biophys. Acta* 48: 20 - 25
- Yamazaki, R.K. & Tolbert, N.E. - (1970) Enzymic characterization of leaf peroxisomes. *J. biol. Chem.* 245: 5137 - 5144
- Yokota, A.; Nakano, Y. & Kitaoka, S. - (1978) Metabolism of glycolate in mitochondria of *EUGLENA GRACILIS*. *Agric. Biol. Chem.* 42: 121 - 129
- Yu, C.; Liang, Z. & Huang, A.H.C. - (1984) Glyoxylate transamination in intact leaf peroxisomes. *Plant Physiol.* 75: 7 - 12
- Zindler-Frank, E. - (1976) Oxalate biosynthesis in relation to photosynthetic pathway and plant productivity - a survey. *Z. Pflanzenphysiol.* 80: 1 - 13

VII. A N H A N G

Enzymnachweise:

Pyruvat-Reduktase (E.C. 1.1.1.27)

(nach GRUBER et al. 1974, modifiziert)

850µl Kaliumphosphat-Puffer, 0.1M, pH 6.4 + 1mg DTT/ml
+ 50µl NADH 3mg/ml
+ 50µl Extrakt

+ 50µl Pyruvat-K 2.5mg/ml

E_{340nm} ; $\epsilon_0 = 6.22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$

Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.35)

(nach OVERATH & RAUFUSS 1967)

725µl Kaliumphosphat-Puffer, 0.05M, pH 6.5
+ 50µl Na-EDTA 15mg/ml
+ 50µl BSA 20mg/ml
+ 50µl NADH 3mg/ml
+ 100µl Extrakt

+ 25µl Acetoacetyl-CoA 4.5mg/ml

E_{340nm} ; $\epsilon_0 = 6.22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$

Malat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.37)

(nach STABENAU 1974a)

915µl Kaliumphosphat-Puffer, 0.1M, pH 7.5
+ 50µl NADH 3mg/ml
+ 10µl Extrakt

+ 25µl Oxalessäure 2mg/ml Puffer (s.oben)

E_{340nm} ; $\epsilon_0 = 6.22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$

Isocitrat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.41 bzw. 1.1.1.42)
(nach COLLINS & MERRETT 1975, modifiziert)

500 μ l HEPES-Puffer, 0.16M, pH 7.5
+ 250 μ l MnCl₂ x 4H₂O 1.3mg/ml
+ 50 μ l DTT 12mg/ml
+ 50 μ l NAD 8.4mg/ml bzw. NADP 10.5mg/ml
+ 100 μ l Extrakt

+ 50 μ l Isocitrat-Na 41mg/ml

$$E_{340\text{nm}}; \epsilon_0 = 6.22 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$$

Glyoxylat-Reduktase (E.C. 1.1.1.79)
(nach STABENAU 1974a, modifiziert)

850 μ l Kaliumphosphat-Puffer, 0.1M, pH 6.4 + 1mg DTT/ml
+ 50 μ l NADH 3mg/ml
+ 50 μ l Extrakt

+ 50 μ l Glyoxylat-Na 2.3mg/ml

$$E_{340\text{nm}}; \epsilon_0 = 6.22 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$$

Hydroxypyruvat-Reduktase (E.C. 1.1.1.81)
(nach STABENAU 1974a)

850 μ l Kaliumphosphat-Puffer, 0.1M, pH 6.3 + 1mg DTT/ml
+ 50 μ l NADH 3mg/ml
+ 50 μ l Extrakt

+ 50 μ l Hydroxypyruvat-Li 2.6mg/ml

$$E_{340\text{nm}}; \epsilon_0 = 6.22 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$$

Glykolat-Oxidoreduktase (E.C. 1.1.3.1)

a) Reduktion von DCPIP:

(nach NELSON & TOLBERT 1970, modifiziert)

100µl Extrakt
+ 20µl Triton X-100 (1%ig)
10 min bei 4°C inkubieren
+730µl Kaliumphosphat-Puffer, 0.1M, pH 8.0
+100µl DCPIP 0.33mg/ml

+ 50µl Glykolat-Na 10mg/ml
(nach der Thunberg-Technik im Vakuum ausführen)
 E_{600nm} ; $\epsilon_o = 15.6 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$

b) Bildung von Phenylhydrazon:

(nach STABENAU & SÄFTEL 1982)

800µl Kaliumphosphat-Puffer, 0.1M, pH 8.0
+100µl Phenylhydrazin x HCl 15.6mg/ml
+ 50µl Extrakt

+ 50µl Glykolat-Na 10mg/ml
 E_{324nm} ; $\epsilon_o = 17.0 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$

c) Bildung von H_2O_2 :

(in Anlehnung an HRYB & HOGG 1979)

750µl Kaliumphosphat-Puffer, 0.1M, pH 8.0
+ 0.35mg Hydroxybenzoesäure/ml
+ 50µl Aminoantipyrin 5mg/ml
+ 50µl Peroxidase 200U/ml
+ 50µl NaN_3 1mg/ml
+ 50µl Extrakt

+ 50µl Glykolat-Na 10mg/ml

E_{500nm} ; $\epsilon_o = 5.3 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$

d) Verbrauch von O_2 :

(nach STABENAU & SÄFTEL 1982)

800 μ l Kaliumphosphat-Puffer, 0.1M, pH 8.0

+200 μ l Extrakt

+ 5 μ l Katalase 20000U/ml

+ 50 μ l Glykolat-Na 10mg/ml

O_2 -Abnahme in der Rank-Elektrode verfolgen

Oxalat-Oxidase (E.C. 1.2.3.4)

(in Anlehnung an HRYB & HOGG 1979)

750 μ l TRIS-HCl, 0.1M, pH 7.0 + 0.35mg Hydroxybenzoesäure/ml

+ 50 μ l Aminoantipyrin 5mg/ml

+ 50 μ l Peroxidase 200U/ml

+100 μ l Extrakt

+ 50 μ l Oxalat-Na 1mg/ml

E_{500nm} ; $\epsilon_o = 5.2 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$

(in Anlehnung an SIGMA-Oxalat-Bestimmung)

700 μ l Citrat-Puffer, 0.1M, pH 3.5

+ 50 μ l MBTH 0.09mg/ml

+ 50 μ l DMAB 5mg/ml Ethanol + 9ml Puffer (s.oben)

+100 μ l Extrakt

+ 50 μ l Oxalat-Na 1mg/ml

E_{590nm} ;

Acyl-CoA-Oxidoreduktase (E.C. 1.3.99.3)

a) Reduktion von INT:

(nach DOMMES & KUNAU 1976)

710 μ l BICIN-Puffer, 0.2M, pH 8.0 + 0.15% Triton X-100

+100 μ l INT 1.3mg/ml

+ 50 μ l Meldolablauf 0.6mg/ml

+100 μ l Extrakt

+ 40 μ l Acyl-CoA 2.5mg/ml

$E_{492\text{nm}}$; $\epsilon_0 = 19.4 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$

b) Bildung von H_2O_2 :

(nach GERHARDT 1981)

650 μ l Kaliumphosphat-Puffer, 0.1M, pH 7.5
+ 0.35mg Hydroxybenzoesäure/ml

+ 50 μ l Aminoantipyrin 5mg/ml

+ 50 μ l FAD 0.8mg/ml

+ 50 μ l Peroxidase 110U/ml

+ 50 μ l NaN_3 1mg/ml

+100 μ l Extrakt

+ 50 μ l Palmitoyl-CoA 2.5mg/ml

$E_{500\text{nm}}$; $\epsilon_0 = 5.2 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$

c) Verbrauch von O_2 :

(nach GERHARDT 1981)

700 μ l Kaliumphosphat-Puffer, 0.1M, pH 7.5

+300 μ l Extrakt

+ 50 μ l Palmitoyl-CoA 2.5mg/ml

O_2 -Abnahme in der Rank-Elektrode verfolgen

Uricase (1.7.3.3)

(nach STABENAU & BEEVERS 1974)

780 μ l Borat-NaOH-Puffer, 20mM, pH 9.5

+200 μ l Extrakt

+ 20 μ l Harnsäure 10mg/ml 1N NaOH + 9ml H₂O

E_{292nm}; ϵ_0 = 12.2 cm² / μ mol

Cytochrom-C-Oxidase (E.C. 1.9.3.1)

(nach FEIERABEND & BEEVERS 1972)

100 μ l Digitonin 0.65mg/ml Puffer (s.unten)

+100 μ l Extrakt

10min bei Raumtemperatur inkubieren

+750 μ l Kaliumphosphat-Puffer, 0.1M, pH 7.0

+ 50 μ l Cytochrom C 22mg/ml Puffer, mit Na₂S₂O₄ reduziert

E_{550nm}; ϵ_0 = 13.5 cm² / μ mol

Katalase (E.C. 1.11.1.6)

(nach LÜCK 1965)

950 μ l Kaliumphosphat-Puffer, 0.1M, pH 7.0 + 0.021% H₂O₂

+ 50 μ l Extrakt

E_{240nm}; ϵ_0 = 0.067 cm² / μ mol

Glycylmethyltransferase (E.C. 2.1.1.20)

(in Anlehnung an HEADY & KERR 1973)

650µl TRIS-HCl, 0.05M, pH 8.6

+ 50µl DTT 3mg/ml

+ 50µl S-Adenosyl-Methionin-Iodid 0.8mg/ml

+200µl Extrakt

+ 50µl Glycin 15mg/ml

30min bei Raumtemperatur inkubieren,

danach 1min bei 80°C,

Nachweis von Sarcosin in Anlehnung an FRISELL & MACKENZIE 1970:

400µl Ansatz (s.oben)

+430µl Kaliumphosphat-Puffer, 0.1M, pH 7.5

+100µl DCPIP 0.3mg/ml

+ 20µl PMS 0.1%

+ 50µl Sarcosin-Dehydrogenase 5U/ml

Extinktion bei 600nm vor und ca. 30min nach Zugabe von

Sarcosin-Dehydrogenase, $\epsilon_{600} = 15.6 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$

Serinhydroxymethyltransferase (E.C. 2.1.2.1)

(nach WINKLER et al. 1982)

100µl Triton X-100 0.2% in Puffer (s.unten)

+100µl Extrakt

+ 10µl THF 5.6mg + 80µl Mercaptoethanol + 920µl Puffer (s.u.)

10 min bei 30°C inkubieren

+530µl Kaliumphosphat-Puffer, 0.1M, pH 7.5

+ 50µl Pyridoxalphosphat 0.25mg/ml

+ 50µl KCl 37mg/ml

+ 50µl NADP 10.5mg/ml

+ 10µl 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat-Dehydrogenase 1.5U/ml

+100µl DL-Serin 60mg/ml

$E_{340\text{nm}}$; $\epsilon_{340} = 6.22 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$

Carnitin-Acetyltransferase (E.C. 2.3.1.7.)

(nach BIEBER et al. 1972, modifiziert)

(50µl Digitonin 0.65mg/ml)

+ 50µl Extrakt

(5 min bei Raumtemperatur inkubieren)

+710µl TRIS-HCl, 0.1M, pH 7.8

+ 20µl Na-EDTA 9mg/ml

+100µl DTNB 3mg/ml Puffer (s.oben)

+ 20µl Acetyl-CoA 2.5mg/ml

+ 50µl DL-Carnitin 10mg/ml

$E_{412nm}; \epsilon_o = 13.6 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$

Rückreaktion:

(nach CHASE 1969)

(50µl Digitonin 0.65mg/ml)

+ 50µl Extrakt

(5 min bei Raumtemperatur inkubieren)

+780µl TRIS-HCl (s.oben)

+ 20µl Na-EDTA 9mg/ml

+ 50µl Co-Enzym A 15mg/ml

+ 50µl Acetyl-Carnitin 24mg/ml

$E_{232nm}; \epsilon_o = 4.5 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$

Thiolase (E.C. 2.3.1.9)

(nach GERHARDT 1983, modifiziert)

720µl Kaliumphosphat-Puffer, 0.1M, pH 7.5 + 0.05mg MnCl_2 /ml
+ 0.3mg DTT/ml + 0.4mg Malat-Na/ml

+100µl Extrakt

+ 50µl Co-Enzym A 15mg/ml

+ 50µl NAD 3mg/ml

+ 10µl Citratsynthetase 220U/ml

+ 10µl Malat-Dehydrogenase 1000U/ml

+ 50µl Triton X-100 1%ig

+ 10µl Acetoacetyl-CoA 2.5 mg/ml

$E_{340nm}; \epsilon_o = 6.22 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$

Carnitin-Palmitoyltransferase (E.C. 2.3.1.21)

(nach BIEBER et al. 1972, modifiziert)

100µl Digitonin 0.65mg/ml
+100µl Extrakt
5 min bei Raumtemperatur inkubieren
+510µl TRIS-HCl, 0.1M, pH 7.8
+ 20µl Na-EDTA 9mg/ml
+ 20µl Palmitoyl-CoA 1mg/ml
+100µl DTNB 3mg/ml Puffer (s.oben)

+ 50µl DL-Carnitin 10mg/ml
E_{412nm}; $\epsilon_0 = 13.6 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$

Glycinacetyltransferase (E.C. 2.3.1.29)

(nach McGILVRAY & MORRIS 1971, modifiziert)

600µl Kaliumphosphat-Puffer, 0.1M, pH 7.5
+100µl DTNB 0.5mg/ml Puffer (s.oben)
+100µl Acetyl-CoA 2.5mg/ml
+100µl Extrakt

+100µl Glycin 75mg/ml
E_{412nm}; $\epsilon_0 = 13.6 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$

Oxalatacetyltransferase

(in Anlehnung an JAKOBY et al. 1956)

Reaktion: Acetyl-CoA + Oxalat $\longrightarrow$ Acetat + Formiat + CoA

750µl Kaliumphosphat-Puffer, 0.1M, pH 6.9
+ 50µl MgCl₂ 20mg/ml
+ 50µl Thiaminpyrophosphat 0.3mg/ml
+100µl Extrakt

+ 50µl Oxalat-Na 8mg/ml
E_{412nm}; $\epsilon_0 = 13.6 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$

Glutamat-Glyoxylat-Aminotransferase (E.C. 2.6.1.4)

(nach WINKLER et al. 1982)

250µl Kaliumphosphat-Puffer, 0.1M, pH 7.5

+ 50µl Pyridoxalphosphat 0.25mg/ml

+ 50µl Glyoxylat 17mg/ml

+100µl Extrakt

+ 50µl Glutamat-Na 38mg/ml

15 min bei 30°C inkubieren

2 min auf 80°C erhitzen

840µl Kaliumphosphat-Puffer, 0.1M, pH 7.5

+ 50µl NADH 3mg/ml

+100µl Ansatz (s.oben)

+ 10µl Glutamat-Dehydrogenase 100U/ml

Extinktion bei 340nm vor und ca. 30 min nach Zugabe von
Glutamat-Dehydrogenase, $\epsilon_{\text{cm}} = 6.22 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$

Serin-Glyoxylat-Aminotransferase (E.C. 2.6.1.45)

(nach WINKLER et al. 1982)

250µl HEPES-Puffer, 50mM, pH 8.0

+ 50µl Pyridoxalphosphat 0.25mg/ml

+ 50µl Glyoxylat 17mg/ml

+100µl Extrakt

+ 50µl Serin 14mg/ml

Der Nachweis von Glycin erfolgte säulenchromatographisch
nach der Methode von GODEL et al. (1984).

Serin-Pyruvat-Aminotransferase (E.C. 2.6.1.51)

(nach WINKLER et al. 1982)

Test entsprechend den Angaben für die Serin-Glyoxylat-AT,
jedoch wurde Glyoxylat durch Pyruvat (16mg/ml) ersetzt.
Der Nachweis von Alanin erfolgte säulenchromatographisch
nach der Methode von GODEL et al. 1984).

Phosphoglykolat-Phosphatase (E.C. 3.1.3.18)

(nach JAMES & SCHWARTZBACH 1982)

Aufschlußmedium:

- 20mM Kalium-Cacodylat-Puffer, pH 6.3
- + 10mM Citronensäure
- + 10mM β -Mercaptoethanol
- + 10% Glycerin

Reaktionsansatz:

- 750 μ l Kalium-Cacodylat-Puffer, 30mM, pH 6.3
- + MgCl_2 0.2mg/ml
- +200 μ l Extrakt
-
- + 50 μ l Phosphoglykolat 68mg/ml

30 min bei 20°C inkubieren,
mit 500 μ l Trichloressigsäure (7.5% w/v) abstoppen,
1 Stunde bei 4°C inkubieren,
15 min bei 3000 xg zentrifugieren,
Überstand zur Phosphat-Bestimmung verwenden.

Phosphat-Bestimmung:

(nach KOCH & KOCH-DEDIC 1974)

- 1,5ml Probe (s.oben)
- +0.5ml Schwefelsäure (3.6 N)
- +0.5ml Reaktionsgemisch (1 Teil Lsg.A + 1 Teil Lsg.B, s.unten)

Nach ca. 5 min bei 405nm gegen den Blindwert messen,
Berechnung mit Hilfe einer Phosphat-Eichkurve.

Lösung A: 0.25g NH_4VO_3 in 50ml kochendem Wasser lösen,
+ 2ml HNO_3 (konz.), mit Wasser auf 100ml auffüllen.

Lösung B: 10g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ bei 50°C in 50ml Wasser lösen,
+ 10ml H_2SO_4 (konz.), mit Wasser auf 100ml
auffüllen.

Oxalat-Decarboxylase (E.C. 4.1.1.2)

(in Anlehnung an JAKOBY et al. 1956)

450µl Citrat-Puffer, 0.1M, pH 3.5

+ 500µl Extrakt in Citrat-Puffer (s.o.)

+ 50µl Oxalat-Na 1mg/ml

30min bei 25°C inkubiert,

5min bei 95°C, 30min bei 4°C, danach zentrifugieren.

700µl Kaliumphosphat-Puffer, 0.1M, pH 7.0

+ 50µl NAD 4.5mg/ml

+ 200µl Ansatz (s.o.)

+ 50µl Formiat-Dehydrogenase 10U/ml

Extinktion bei 340nm vor und ca. 30 min nach Zugabe von
Formiat-Dehydrogenase, $\epsilon_{340} = 6.22 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$

Glyoxylat-Carboligase (E.C. 4.1.1.47)

(in Anlehnung an GUPTA & VENNESLAND 1966)

250µl Kaliumphosphat-Puffer, 0.1M, pH 7.0

+ 50µl MgCl_2 9mg/ml Puffer (s.o.)

+ 50µl Thiaminpyrophosphat 4.5mg/ml Puffer (s.o.)

+ 50µl Cystein 9mg/ml Puffer (s.o.)

+ 50µl FAD 1.5mg/ml

+ 1000µl Extrakt

10min mit Helium begast,

+ 50µl Glyoxylat 1.1mg/ml

Proben nach 0, 45 und 90 Minuten entnommen; kontinuierliche
Begasung des Reaktionsansatzes mit Helium.

Auftrennung der organischen Säuren mittels HPLC: siehe Kap. 3

Als Referenz diente die Zusammensetzung der organischen
Säuren eines Parallelversuches, der statt Extrakt 50µl
angereicherte Glyoxylat-Carboligase aus E. coli enthielt.

Die Anzucht von E. coli (Stamm-Nr. 1498, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen der DSM Göttingen) sowie die Reinigung der Glyoxylat-Carboligase mittels Ammoniumsulfat-Fällung erfolgte nach Angaben von GUPTA & VENNESLAND (1966).

Isocitrat-Lyase (E.C. 4.1.3.1)

(nach DIXON & KORNBERG 1959, modifiziert)

800µl Kaliumphosphat-Puffer, 0.1M, pH 7.0,
+ 1mg MgCl₂/ml, + 0.25mg DTT/ml
+ 50µl Phenylhydrazin 9mg/ml (lichtgeschützt)
+100µl Extrakt

+ 50µl Isocitrat-DL-Na 18mg/ml

$E_{324nm}; \epsilon_o = 17.0 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$

Malatsynthetase (E.C. 4.1.3.2)

(nach DIXON & KORNBERG 1962, modifiziert)

800µl Tricin-Puffer, 0.05M, pH 8.0, + 1mg MgCl₂/ml
+ 50µl Acetyl-CoA 2.5mg/ml
+100µl Extrakt

+ 50µl Glyoxylat-Na 5.5mg/ml

$E_{232nm}; \epsilon_o = 4.5 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$

Citrat-Synthetase (E.C. 4.1.3.7)

(nach HUANG et al. 1974)

800µl Tricin-Puffer, 0.1M, pH 8.0 + 1.6mg MgCl₂/ml
+ 0.35mg Oxalessigsäure/ml
+ 50µl DTNB 12mg/ml Tricin-Puffer (s.o.)
+100µl Extrakt

+ 50µl Acetyl-CoA 2.5mg/ml

$E_{412nm}; \epsilon_o = 13.6 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$

Fumarase (E.C. 4.2.1.2)

(nach COOPER & BEEVERS 1969)

850 μ l Kaliumphosphat-Puffer, 0.05M, pH 7.4

+100 μ l Extrakt

+ 50 μ l Malat-L-Na 47mg/ml

E_{240nm} ; $\epsilon_0 = 2.6 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$

Enoyl-CoA-Hydratase (E.C. 4.2.1.17)

(nach OVERATH & RAUFUSS 1967)

730 μ l Diethanolamin-Puffer, 0.1M, pH 9.5

+ 50 μ l Na-EDTA 15mg/ml

+ 50 μ l NAD 4.1mg/ml

+ 20 μ l Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase 100U/ml

+100 μ l Extrakt

+ 50 μ l Crotonyl-CoA 1.7mg/ml

E_{340nm} ; $\epsilon_0 = 6.22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$

Acetyl-CoA-Synthetase (E.C. 6.2.1.1)

(nach BERG 1962)

840 μ l Tricin-Puffer, 0.05M, pH 7.5 + 7.5mg KCl/ml,

+ 2mg MgCl_2 /ml, + 0.28mg ATP/ml

+ 10 μ l Co-Enzym A 15mg/ml

+100 μ l Extrakt

+ 50 μ l Acetat-Na 16mg/ml

E_{232nm} ; $\epsilon_0 = 4.5 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$

Oxalyl-CoA-Synthetase (E.C. 6.2.1.8)

(in Anlehnung an GIOVANELLI 1966)

580µl Tris-Puffer, 0.1M, pH 7.8
+ 50µl ATP 30mg/ml
+ 50µl MgCl₂ 20mg/ml
+ 20µl Co-Enzym A 15mg/ml
+ 50µl Glutathion 15mg/ml
+200µl Extrakt

+ 50µl Oxalat-K 37mg/ml

Nachweis von AMP mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie
nach 0, 15 und 30 Minuten.

AMP-Nachweis nach COOPER 1971.

Glycin-Reduktase

(nach TURNER & STADTMAN 1973, modifiziert)

550µl Tricin-Puffer, 0.1M, pH 8.1
+ 50µl K₂HPO₄ 90mg/ml
+ 50µl AMP 29mg/ml
+ 50µl ADP 36mg/ml
+ 50µl Co-Enzym A 2mg/ml
+ 50µl DTT 99mg/ml
+ 50µl MgCl₂ 24mg/ml
+100µl Extrakt

+ 50µl Glycin 60mg/ml

Proben nach 0, 15 und 30 Minuten entnommen; Nachweis von
Acetat mittels HPLC (Kapitel 3).

Bestimmung des Gesamt-Chlorophyllgehaltes:

(nach Angaben von PARSONS & STRICKLAND 1963)

0.2 ml Probe
+ 1.8 ml Aceton

10 min in verschlossenen Zentrifugenröhrchen
bei 30° C inkubieren, danach zentrifugieren.

Extinktion des Überstandes bei 630, 645, 665 und 750nm messen.
(Die Extinktion bei 750nm dient als Blindwert)

Berechnung:

$$(E_{665} \times 11.6 - E_{630} \times 0.14 - E_{645} \times 1.31) \times 10 =$$

µg Chlorophyll a / ml Probe x cm Lichtweg

$$(E_{650} \times 55.0 - E_{645} \times 16.3 - E_{665} \times 4.64) \times 10 =$$

µg Chlorophyll c / ml Probe x cm Lichtweg

Proteinbestimmung:

(nach LOWRY et al. 1951)

0.1 ml Probe
+ 1.9 ml Reagenz I = 100 ml Na₂CO₃ (5% in 0.25 M NaOH)
+ 5 ml K-Na-tartrat (2%)
+ 5 ml CuSO₄ x 5 H₂O (1%)

schütteln und 10 min ins Dunkle stellen.

+ 3.0 ml Reagenz II = 10 ml Folin-Ciocalteus-Reagenz/100 ml
schütteln und 30 min ins Dunkle stellen, danach Extinktion
bei 540nm messen.

(Standard: BSA-Lösung, Blindwert: H₂O)

Eine Extinktion von 0.1 entspricht 0.5 mg Protein / ml Probe

Extraktion von löslichem intrazellulären Oxalat:
(in Anlehnung an die Methode von BAKER 1952)

Algenmaterial (ca. 6g Frischgewicht) + 10 ml H_2O + 20 ml
Glasperlen im Virtis-Homogenisator aufschließen.

Homogenat (incl. Glasperlen) in ein Becherglas überführen,
mit 2 x 5 ml H_2O nachwaschen und 15 min kochen.

Lösung mit H_2O auf 40 ml auffüllen und über Nacht bei
4° C inkubieren.

Lösung durch ein feinporiges Filter filtrieren, 10 ml des
Filtrates in ein Zentrifugenglas (Spitzboden) geben, je
1 ml HCl (6 N) und Wolfram-Reagenz (s.u.) zufügen, schütteln
und 5 Std. bei Raumtemperatur inkubieren.

Lösung 10 min bei 3000 xg zentrifugieren, 8 ml des Überstandes
in ein Zentrifugenglas (s.o.) geben und tropfenweise
Ammoniak-Lösung (18 N) zufügen, bis ein Niederschlag
erscheint.

Zu dieser Lösung wird 1 ml $CaCl_2$ -Lsg. gegeben, geschüttelt
und über Nacht bei 4° C inkubiert.

Lösung 10 min bei 3000 xg zentrifugieren, Überstand ver-
werfen und das Präzipitat mit 8 ml Wasch-Lösung (s.u.)
waschen.

Präzipitat in 1 ml H_2SO_4 (3.5 N) lösen, 2 min kochen, mit
 H_2O auf 7 ml auffüllen und für die HPLC-Analyse verwenden.

Wolfram-Reagenz: 2.4 g Na-wolframat in 80 ml H_2O lösen,
4 ml konz. Phosphorsäure (48 N) zugeben und
mit H_2O auf 100 ml auffüllen.

$CaCl_2$ -Lösung: 33 g Na-acetat + 2.5 g $CaCl_2$ (wasserfrei) in
50 ml Essigsäure (50% v/v) lösen.

Wasch-Lösung: 5% (v/v) Essigsäure (Bei 20° C über Ca-Oxalat
aufbewahren; vor Gebrauch filtrieren;

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. H. Stabenau, danke ich herzlich für die Anregung zur Bearbeitung der vorliegenden Problemstellung, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und für die stetige Förderung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. U. Winkler und Herrn W. Säftel, insbesondere für die Unterstützung bei den Markierungsversuchen.

LEBENS LAUF

Wolfgang Groß, geboren am 17. April 1958 in Westerstederfeld (Landkreis Ammerland) als Sohn des Lagerarbeiters Paul Groß und seiner Ehefrau Lisa, geb. Hellwig

1965 - 1968	Volksschule Westerloy
1969	Volksschule Westerstede
1970 - 1978	Gymnasium Westerstede
29.05.1978	Abitur
1.12.1978	Heirat mit Sabine Wiedenhöft aus Westerstede
WS 1979/80	Studienbeginn an der Universität Oldenburg im Studiengang Lehramt Chemie/Physik
SS 1980	Wechsel vom Lehramt-Studiengang zum Studiengang Diplom Biologie
18.02.1982	Vordiplom im Fach Biologie
Februar 1983	Beginn der Diplomarbeit über das Thema: "Der Glykolat-Stoffwechsel bei Grünalgen aus phylogenetischer Sicht" unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Stabenau
10.12.1984	Diplom im Fach Biologie
April 1985	Beginn der Arbeiten an der Dissertation unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Stabenau an der Universität Oldenburg
September 1986	Abschluß der experimentellen Arbeiten an der vorliegenden Dissertation

